

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Q. FEVER EXPÉRIMENTALE DE QUELQUES ANIMAUX DOMESTIQUES

par GEORGES BLANC, L.-A. MARTIN et J. BRUNEAU.

(Institut Pasteur, Casablanca.)

En 1946, nous trouvions dans le sud marocain, à Goulimine, des Hyalomma (*H. savignyi*) infectés de *Rickettsia burneti* (1).

A cette époque, la Q. fever n'était connue que d'Australie et des Etats-Unis ; les travaux des Allemands, des Grecs et des Américains sur la *Balkan Grippe*, alias Q. fever, n'étaient pas publiés ou n'étaient pas accessibles aux chercheurs ; la répartition de cette rickettsiose apparaissait donc assez surprenante. Quel rapport, quel lien pouvait unir l'Australie à l'Amérique et au Maroc ? Comme rien ne pourrait justifier l'apparition d'une même espèce de rickettsie en plusieurs points du globe, aussi éloignés et aussi différents, force nous était de chercher comment *Rickettsia burneti*, peut-être d'origine australienne puisqu'un réservoir de virus vertébré avait été trouvé dans le Queensland, avait pu gagner les autres régions où se retrouve la Q. fever (2).

Le fait que les tiques trouvées infectées et les tiques infectables appartiennent à plusieurs genres communs sur les animaux domestiques nous avait incités à supposer que ces derniers devaient au moins servir de supports, de vecteurs des tiques infectées et

(1) G. BLANC, L.-A. MARTIN et A. MAURICE, *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 438.

(2) Depuis que nous avons trouvé un autre « réservoir de virus » au Maroc, le Merion, cet argument perd sa valeur et l'origine de la Q. fever n'est pas obligatoirement australienne. Cf. G. BLANC, L.-A. MARTIN et A. MAURICE, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1673 et G. BLANC, J. BRUNEAU, L.-A. MARTIN et A. MAURICE, *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 607.

les transmettre à d'autres animaux domestiques au cours des transhumances (3) et aussi peut-être assurer la diffusion de l'infection à travers le monde par l'intermédiaire des peaux et des laines.

Le transport par ce que les vieux épidémiologistes appelaient le « fomes » (4), c'est-à-dire par support inanimé, paraît bien être la cause de l'intéressante épidémie de Q. fever observée récemment en Suisse par Wegmann (5).

Si les animaux domestiques peuvent jouer le rôle de vecteurs passifs, ils pourront jouer un rôle encore plus important s'ils sont eux-mêmes sensibles à l'infection et capables d'infecter les tiques qui se gorgent sur eux.

C'est pourquoi, dès le début de nos recherches sur la Q. fever, nous avons étudié la sensibilité de différents animaux domestiques, bovins, chiens, chameaux, agneaux et chevreux (6) et recherché si les tiques gorgées sur eux pouvaient s'infecter.

Voici la relation succincte de nos expériences.

INFECTION DES BOVINS (7).

1° *Génisse* 282. — Inoculée le 14 octobre 1946 ; elle reçoit 4 cm³ dans la cuisse gauche et 9 cm³ par voie intrapéritonéale d'une suspension virulente de la rate et des tissus de la cuisse d'un cobaye qui a fait une très belle réaction locale d'inoculation, riche en rickettsies. La génisse est sacrifiée le 22 octobre. Un fragment de rate est broyé en eau physiologique et 2 cobayes

(3) Un fait d'observation récente est en faveur de cette hypothèse. En décembre 1948, nous avons recueilli, avec le professeur Ch. Joyeux, au souk de Goulimine, dans le Sud marocain, des *Hyalomma* ♀ (*H. dromedarii*) gorgées sur des chameaux et infectées ; les chameaux venaient de Mauritanie, à plus de 1.000 km. au sud de Goulimine. Quels que soient les gîtes d'étape (qui peuvent être à plus d'une semaine de marche) où se sont fixées les tiques sur ces animaux, il apparaît que de gîte en gîte, à travers le Sahara, la dispersion de l'infection est assurée. Nul doute qu'on trouvera des *H. dromedarii* infectés dans le sud de la Mauritanie. G. B.

(4) *Omne corpus inanimatum, ad quod haec transmissio fit, et quod pestilens venenum recipere, atque aliquamdiu servare potest appellatur fomes* écrit Diemerbroeck à la page 58 de son *Tractatus de Peste*, Amstelædami, 1665.

(5) T. WEGMANN, *Schweiz. med. Wochenschr.*, 1948, 78, 529.

(6) G. BLANC, J. BRUNEAU, L.-A. MARTIN et A. MAURICE, *C. R. Acad. Sci.*, 1948, 226, 607.

(7) L'infection expérimentale a déjà été réalisée en Australie, E. H. DERRICK, W. SMITH et H. E. BROWN, *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1942, 20, 115. Parker, aux Etats-Unis, infecte 2 vaches laitières par inoculation intramammaire, mais inocule sans succès 4 génisses, R. R. PARKER, E. J. BELL et DAVID B. LACKMAN, *Am. J. Hyg.*, 1948, 48, 191.

inoculés, l'un dans la cuisse, l'autre par voie intrapéritonéale. Ce dernier ne s'infecte pas, l'autre fait une infection avec une réaction fébrile légère et résiste à une inoculation d'épreuve.

2° *Génisse* 2. — Inoculée le 23 janvier 1948. Le produit virulent est constitué par la rate et les surrénales de 2 cobayes infectés et par le broyat de 100 *Hyalomma* infectés sur cobayes. D'innombrables rickettsies sont décelées sur frottis du broyat de tiques. Le tout est dilué dans 50 cm³ d'eau physiologique et inoculé sous la peau de l'encolure, à gauche. Réaction fébrile nette (v. courbe I). Le sang prélevé en période fébrile se montre virulent pour le cobaye. Il ne l'est plus à l'apyrexie le 31 mars.

Des boophiles ♀ gorgées sont recueillies sur la génisse le 29 janvier, premier jour d'apyrexie, elles sont reconnues infectées. D'autres, recueillies le 31 janvier, le sont également (passage positif au cobaye).

Du sang, pris à plusieurs reprises, donne une réaction d'agglutination positive avec notre antigène de rhipicephales (8).

Négative avant l'inoculation, elle est positive au 1/5 le neuvième jour, elle atteint le 1/10 du quinzième au vingt-cinquième jour et devient négative le trente-troisième jour.

3° *Taurillon*. — Inoculé le 23 mars 1948 ; 200 rhipicéphales nourris à l'état larvaire et à l'état lymphal sur des cobayes infectés sont broyés dans 20 cm³ d'eau physiologique. Innombrables rickettsies sur frottis. 15 cm³ sont inoculés au niveau de la hanche droite. L'animal fait une forte réaction fébrile du deuxième au septième jour après l'inoculation (v. courbe II). Le 24 mars, prise de sang, qui se montre virulent par inoculation au cobaye. Le même jour, les larves de boophiles gorgées sont recueillies. Inoculées au cobaye, elles se montrent virulentes.

Les réactions d'agglutination faites du deuxième jour au trentième jour après l'inoculation sont positives du quatrième au trentième jour.

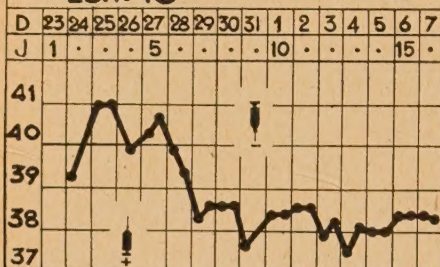
2° jour (24 mars)	1/5 0
4° jour (26 mars)	1/5 +++ ±
8° jour (30 mars)	1/5 +++
11° jour (2 avril)	1/5 +++++ 1/10 +++
15° jour (7 avril)	1/15 +++++ 1/20 +++
19° jour (10 avril)	1/20 +++++ 1/30 +++
25° jour (16 avril)	1/10 +++++ 1/20 +++
30° jour (21 avril)	1/5 +++++ 1/10 +

La réaction de déviation du complément reste douteuse ou légère. Le onzième jour, elle est positive avec un sérum dilué au 1/4.

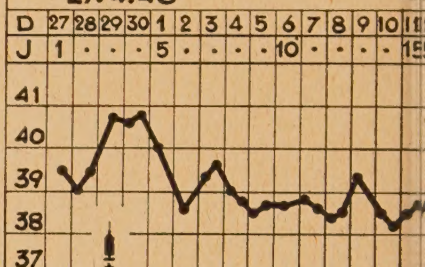
(8) G. BLANC, J. BRUNEAU, R. POITROT et B. DELAGE, *Bull. Acad. Méd.*, 1948, 132, 243.

GENISSE 2
23.1.48

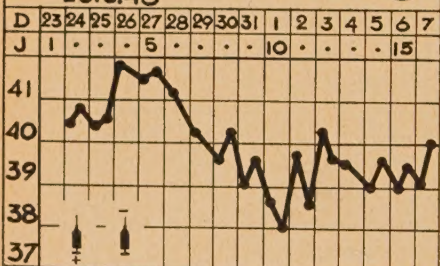
I

**CHIEN 1**
27.4.48

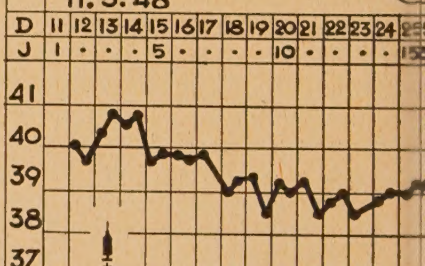
IV

**TAURILLON**
23.3.48

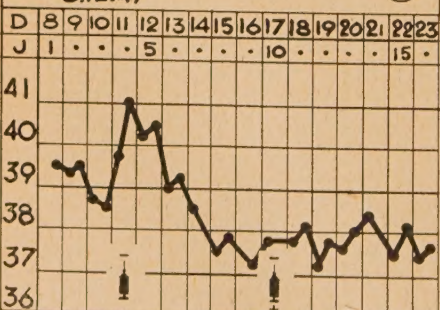
II

**CHIEN 3**
11.5.48

V

**CHAMELON**
8.12.47

III

**CHEVREAU 1**
19.12.46

VI

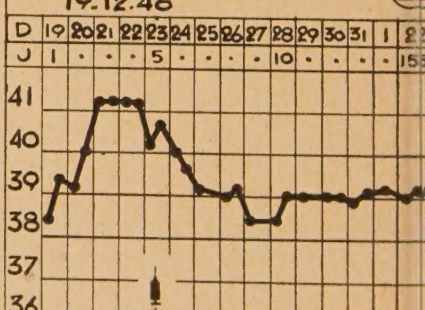


FIG. 4. — Courbes de température de bovins, chiens, chameau, chevreau au cours de la Q. fever expérimentale.

INFECTION DES CHIENS (9).

1° *Chien 1.* — Inoculé le 27 avril 1948. Il reçoit sous la peau de la cuisse gauche 6 cm³ d'une suspension de la rate et des surrénales d'un cobaye et le broyat de 20 rhipicéphales infectés dans 20 cm³ d'eau physiologique ; l'animal fait une forte poussée de température pendant trois jours (v. courbe IV), il ne présente pas d'autre symptôme d'infection.

Le 29 avril, le sang est trouvé virulent (passage au cobaye).

Le 30 avril, en pleine période fébrile, 3 ♀ de rhipicéphales gorgées sont recueillies sur le chien, broyées et inoculées à un cobaye, qui fait une réaction fébrile d'interprétation douteuse.

Le 4 mai, trois jours après la chute de température, 7 rhipicéphales ♀ gorgées sont prises sur le chien et inoculées à un cobaye qu'elles infectent. La réaction d'agglutination, suivie pendant cent six jours, était positive au 1/10 le soixante-deuxième jour, elle l'était encore au 1/5 le quatre-vingt-onzième jour.

8° jour (4 mai 1948)	1/5 +++++
15° jour (11 mai 1948)	1/40 +++++ 1/30 ++
22° jour (18 mai 1948)	1/40 +++++ 1/30 ++
30° jour (26 mai 1948)	1/50 +++++
45° jour (10 juin 1948)	1/20 +++++ 1/40 ++
55° jour (20 juin 1948)	1/10 +++++ 1/20 +++ ±
62° jour (27 juin 1948)	1/10 +++ ±
71° jour (6 juillet 1948)	1/5 ±
80° jour (15 juillet 1948)	1/5 +++
91° jour (26 juillet 1948)	1/5 +++++ 1/10 —
106° jour (10 août 1948)	1/5 —

2° *Chien 3.* — Inoculé le 11 mai 1948.

Il reçoit sous la peau de la cuisse 10 cm³ d'une suspension de virus constituée par la rate et les surrénales d'un cobaye infecté broyées dans 40 cm³ d'eau physiologique. Réaction fébrile bien marquée pendant deux jours (v. courbe V).

Du sang est prélevé le troisième jour, la température étant à 39°8 et inoculé à un cobaye qui réagit.

La réaction d'agglutination, recherchée pendant quinze jours, reste négative.

INFECTION DU CHAMEAU.

Un chamelon (*C. dromedarius*) est inoculé le 8 décembre 1947. Il reçoit, à l'encolure, 15 cm³ d'une suspension virulente constituée par le broyat de 100 rhipicéphales infectés où se rencontrent

(9) La réceptivité du chien a été démontrée par Derrick et ses collaborateurs, E. H. DERRICK, D. W. JOHNSON, D. J. W. SMITH et H. E. BROWN, *Austr. J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1938, 16, 245.

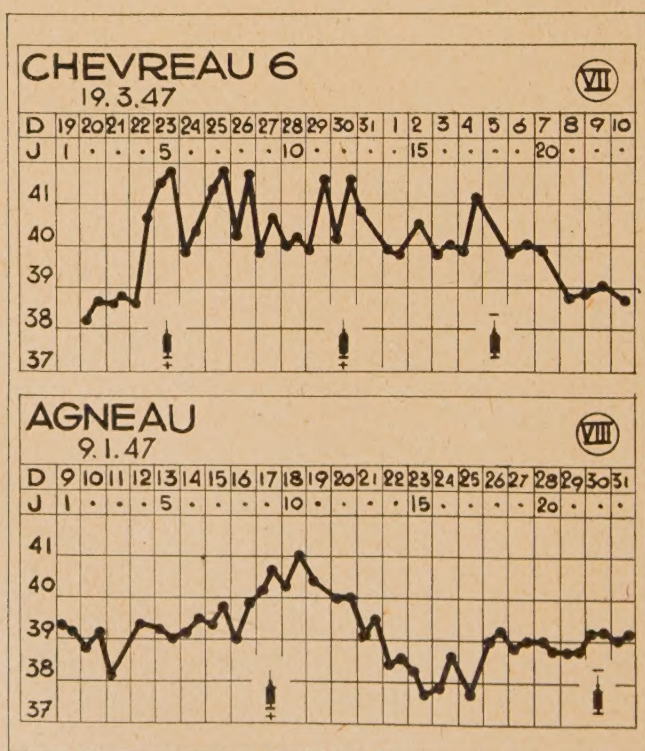
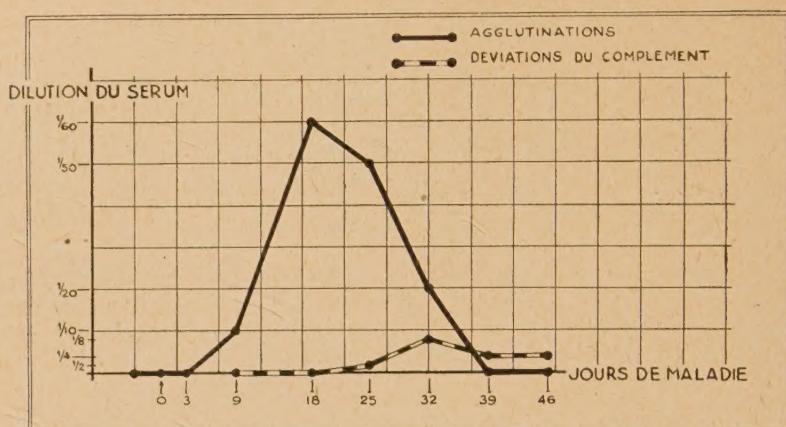


FIG. 2. — Courbes de température de chevreau et agneau au cours de la Q. fever expérimentale.

d'innombrables rickettsies. Forte poussée de température pendant trois jours (v. courbe III).

A l'acmé de la fièvre (41°) le virus ne peut être isolé du sang. Au dixième jour, une seconde inoculation de sang au cobaye donne une réaction douteuse.

La réaction d'agglutination est recherchée les troisième, neu-neuvième et quarante-sixième jours après l'inoculation. Elle s'avère positive du neuvième au trente-deuxième jour. Elle atteint 1/60 le dix-huitième jour.

La réaction de déviation du complément est légèrement positive au vingt-cinquième jour, elle l'est encore au quarante-sixième jour et atteint son maximum au trente-deuxième jour (v. graphique I).

INFECTION DE L'AGNEAU.

Agneau inoculé le 9 janvier 1947. Reçoit dans la cuisse droite 5 cm³ de la suspension virulente de 4 membranes du jaune d'œufs embryonnés, broyées dans 40 cm³ de bouillon.

Forte réaction fébrile (v. courbe VIII) du neuvième au treizième jour, accompagnée de boiterie et suivie d'un fort amaigrissement. Le sang pris au neuvième jour se montre virulent (passage cobaye), l'animal inoculé le 30 janvier se montre immun.

INFECTION DES CHEVREAUX (10).

Chevreau 1. — Inoculé le 19 décembre 1946. Reçoit en injection sous-cutanée, à la face interne de la cuisse gauche, 7 cm³ de suspension de la membrane broyée du jaune d'un œuf dans 10 cm³ de bouillon.

Réaction fébrile du deuxième au cinquième jour de l'inoculation (v. courbe VI). Réaction locale avec ganglion précrural très augmenté de volume; l'animal paraît abattu, il y a un fort amaigrissement, l'adynamie persiste longtemps après la chute de la température.

Le sang prélevé le 23, alors que la température est à 40°2, se montre virulent pour le cobaye. Une réinoculation faite vingt et un jours après la première reste sans effet. Ni réaction fébrile, ni apparition de virus dans le sang.

Chevreau 6. — Inoculé le 19 août 1947. Il reçoit à la face interne de la cuisse gauche 4 cm³ d'une suspension dans 20 cm³ d'eau physiologique de 500 rhipicéphales adultes qui ont été infectés sur cobaye à l'état de larves et de nymphes et contiennent de très nombreuses rickettsies. Un cobaye témoin inoculé éga-

(10) CAMINOPÉTROS, en Grèce, a pu infecter des chèvres laitières et retrouver le virus dans le lait. *Ann. Parasit.*, 1948, 23, 107.

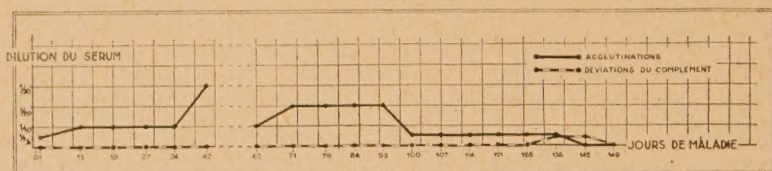
lement avec 4 cm³ de la même dilution fera une très belle réaction.

Le chevreau réagit très fortement à l'inoculation. Longue et forte fièvre, amaigrissement, boiterie (v. courbe VII).

Le 23 août, prise de sang, alors que la température est à 41°9. Le cobaye inoculé réagit.

Le 30 août, nouvelle prise de sang, la température au douzième jour de l'inoculation est à 41°6 l'après-midi, le sang est virulent. Il ne l'est plus le 5 septembre, au dix-huitième jour.

Les réactions d'agglutination ont été faites jusqu'au cent quarante-neuvième jour. Elles étaient encore positives au cent trente-cinquième jour. La réaction de déviation du complément est, dans l'ensemble, restée négative, elle a été positive avec un sérum dilué au 1/4 du cent trente-cinquième au cent quarante-deuxième jour (v. graphique 2).



GRAPHIQUE 2. — Taux d'agglutination et de déviation du complément du chevreau 6 au cours de la Q. fever expérimentale.

Tableau des agglutinations.

Sérum du 20 août 1947	1/3	++++
30 août 1947	1/10	++++
7 septembre 1947	1/10	++++
15 septembre 1947	1/10	++++
22 septembre 1947	1/10	++++
30 septembre 1947	1/30	++++
21 octobre 1947.	1/10	++++
30 octobre 1947.	1/20	++++
7 novembre 1947.	1/20	++++
14 novembre 1947.	1/20	++++
21 novembre 1947.	1/10	++++
28 novembre 1947.	1/5	++++ 1/10 ++
5 décembre 1947.	1/5	++++
12 décembre 1947.	1/5	++++
19 décembre 1947.	1/5	++++ 1/10 +++
26 décembre 1947.	1/5	++++
2 janvier 1948.	1/5	++++ 1/10 +++
9 janvier 1948.	1/5	+++ 1/10 ++
16 janvier 1948.	1/5	0

En résumé, tous les animaux domestiques que nous avons inoculés se sont montrés réceptifs à la Q. fever. Ils font une infection

fébrile avec apparition du virus dans le sang. Ils peuvent infecter les tiques qui se gorgent sur eux au moment de la circulation du virus. De ces faits, il ne faudrait pas conclure que les animaux domestiques constituent un véritable réservoir de virus. L'immunité qui suit une première infection n'en fait des animaux infectants pour leurs tiques que pendant une très courte durée de leur vie.

Ils jouent vis-à-vis de la Q. fever le même rôle que joue le chien vis-à-vis de la fièvre boutonneuse. Ce rôle est important, puisque ces animaux domestiques représentent un considérable agent de transmission. Le véritable réservoir de virus reste cependant l'acarien.

ÉPIDÉMIE DE GRIPPE 1948-1949

ÉTUDE SÉROLOGIQUE ET EXPÉRIMENTALE DU VIRUS

par P. LÉPINE, V. SAUTTER, L. REINIE et J. MAURIN (*).

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

L'épidémie de grippe qui a sévi en France et dans les pays avoisinants au cours de l'hiver 1948-1949 a débuté en Italie à l'automne 1948 et s'est étendue progressivement aux autres pays d'Europe, qui furent inégalement atteints. Elle nous a donné l'occasion de faire des observations intéressantes. Celles-ci peuvent être groupées en deux catégories :

1° Recherches sur les réactions sérologiques spécifiques des sujets atteints de grippe ou supposés tels.

2° Isolement des souches du virus en cause et leur caractérisation par la détermination de leur type antigénique.

I. — RECHERCHES SÉROLOGIQUES.

Les examens sérologiques ont été en majeure partie pratiqués pendant les mois de janvier et février 1949. Nos recherches ont débuté alors que l'épidémie de grippe était déjà établie en France : en fait, elle avait commencé au moins un mois auparavant en Savoie, d'où elle s'est étendue à travers la France en suivant une marche erratique. Les premiers cas groupés sont survenus à Paris vers la fin de l'année 1948, l'épidémie y a atteint son point culminant à la fin de janvier 1949.

Nous avons reçu au total les sérums de 204 sujets. Malgré les recommandations adressées à tous les médecins qui ont bien voulu nous en envoyer, nous n'avons pu obtenir qu'un seul échantillon de sérum dans 48 des cas considérés ; par contre, cent cinquante-six fois nous avons reçu au moins deux échantillons correctement prélevés, à dix jours d'intervalle l'un de l'autre. Dans ce chiffre sont compris les quelques cas pour lesquels nous avons voulu suivre la courbe des anticorps ; dans ce but, il a été prélevé 3 échantillons (chez 15 sujets) ou 5 échantillons (chez 1 sujet).

Bien que parmi les 48 échantillons qui ont été reçus en un seul

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mai 1949

exemplaire, certains aient présenté un taux élevé d'anticorps qui, en temps d'épidémie, pourrait être considéré comme significatif. c'est uniquement sur les 156 sujets ayant fourni un double échantillon qu'ont porté nos statistiques.

TECHNIQUE SUIVIE. — La recherche des anticorps a été pratiquée selon la technique d'hémagglutination précédemment décrite [4], avec la seule addition que les examens ont toujours été conduits en séries parallèles avec les différents antigènes sur des suspensions d'hématies de poule et sur des suspensions d'hématies de cobayes dont la sédimentation se fait plus lentement que celle des hématies aviaires. Nous avons parfois employé, à côté des suspensions d'hématies de cobayes, des suspensions d'hématies humaines du groupe O, sans avantage notable.

Dans tous les cas, l'examen du sérum a été fait simultanément avec plusieurs antigènes préparés par le laboratoire.

Ces antigènes ont été avant tout autre les antigènes classiques A (PR 8) et B (Lee). Mais dès le début des examens, il a été évident que nombre des sujets examinés ne réagissaient ni avec l'un ni avec l'autre de ces antigènes. Grâce à l'obligeance du Prof. C. H. Andrewes, nous avons pu recevoir de Londres les souches caractérisant les virus isolés au cours des épidémies précédentes en Grande-Bretagne et en Suède : la souche Barrett et la souche Gg. Nous avons comparé ces souches avec la souche américaine FM₁ (1947) et, enfin, avec la première souche que nous ayons isolée et qui sera désignée ci-après sous le nom de souche PL.

L'ensemble de ces diverses souches, manifestement reliées au groupe A mais atypiques dans leur pouvoir antigène, peut être considéré comme formant le groupe antigénique qui a souvent été qualifié de A' et que, pour la clarté de l'exposé comme pour la logique, nous préférons désigner sous le terme générique de groupe FM. Ces différents antigènes préparés par le laboratoire ont été employés pour l'examen des 156 sérums avec la fréquence suivante :

A (PR 8)	156 fois.
B (Lee)	156 —
Barrett	131 —
PL	91 —
FM ₁	39 —
Gg	21 —

Les résultats obtenus avec les différentes souches du groupe FM ont été, dans l'ensemble, remarquablement concordants, déduction faite des différences propres aux particularités antigéniques de chaque souche.

En outre, pour contrôler la valeur de nos antigènes, les réactions ont été pratiquées au début, parallèlement six fois avec un anti-

gène A provenant du Centre Mondial de la Grippe (Dr Andrewes) et neuf fois avec un antigène B de même origine : dans tous les cas, les résultats obtenus avec les antigènes préparés par notre laboratoire et ceux provenant du Centre Mondial ont été rigoureusement concordants.

Enfin dans un petit nombre de cas, nous avons effectué sur les mêmes sérums des réactions de déviation du complément avec des antigènes préparés soit par le Centre Mondial de la Grippe, soit par nous-mêmes. Mais nous n'avons pas tenu compte des résultats obtenus dans ces examens qui ont porté sur un nombre trop limité de sérums pour revêtir une valeur statistique.

RÉSULTATS. — Les résultats bruts des 156 examens sérologiques pratiqués sur au moins deux échantillons de sérum du même malade peuvent se résumer ainsi :

1° *Sérums ayant présenté une augmentation significative des anticorps pour le virus A seulement* : cinq (5).

2° *Sérums ayant présenté une augmentation significative des anticorps pour le virus FM seulement* : douze (12).

3° *Sérums ayant présenté une augmentation significative des anticorps à la fois pour le virus A et pour le virus FM* : cinquante-six (56).

4° *Sérums ayant présenté une augmentation significative des anticorps pour le virus B* : zéro (0).

5° *Sérums demeurés négatifs* : quatre-vingt-trois (83).

Nous avons tenu compte d'une augmentation de l'inhibition d'un tube entre les sérums précoce et tardif dans le seul cas où cette différence a été observée sur 2 lots différents d'un même antigène.

Plusieurs remarques s'imposent à la vue de ces résultats bruts :

1° L'absence totale d'élévation du taux des anticorps du groupe B du virus grippal. On verra plus loin que l'isolement des souches confirme que ce virus doit être complètement mis hors de cause en ce qui concerne la présente épidémie.

2° La majeure partie des résultats positifs porte sur des malades dont le taux des anticorps s'est élevé à la fois pour le virus A et pour le groupe FM : nous les qualifions de AFM, et cette simple constatation confirme à la fois que le virus causal de l'épidémie fait partie du groupe général des virus A, mais qu'il diffère de la souche A typique (PR8) dans la même mesure qu'en diffèrent les diverses souches du groupe FM.

3° Néanmoins un petit nombre de sujets ont réagi exclusivement soit pour le virus A typique (5), soit pour le virus FM (12).

Nous verrons par l'examen des souches isolées que cette augmentation unilatérale, pour un type d'anticorps seulement, ne coïncide pas nécessairement avec le type antigène du virus

rencontré, chez le même malade, et quelle explication on en peut donner.

4° La proportion de sérums négatifs (83 sur 156) peut paraître élevée. En réalité, les cas négatifs nécessitent les remarques suivantes :

D'une part, ils comprennent un certain nombre de sujets pour lesquels le diagnostic clinique de grippe était hésitant, voire exclu ; ainsi en est-il des sérums provenant de la Clinique Infantile de Strasbourg (Dr Heitzmann) où étaient hospitalisés à la même époque des nourrissons présentant un syndrome toxique grave dont il ne semblait pas *a priori*, malgré des arguments d'ordre épidémiologique, que l'infection fût due au virus grippal ; nous avons néanmoins joint ces examens à nos recherches tant pour élucider l'origine d'un syndrome demeuré obscur, que pour servir de témoin aux examens de grippe ; de même avons nous conservé à titre de témoins les sérums de certains sujets dont le diagnostic, qui pouvait hésiter lors de l'élévation thermique du début, était déjà reconnu non grippal à la date du 2^e prélèvement.

D'autre part, d'après nos observations, il est évident qu'un certain nombre de malades qui ont été atteints de grippe cliniquement typique, dans des conditions de contagion et d'évolution qui ne laissent place à aucun doute, n'ont néanmoins pas réagi à leur infection par une élévation significative du taux des anticorps. La preuve qu'il s'agissait néanmoins de grippe certaine chez ces sujets est apportée, comme on le verra plus loin, par l'isolement de souches de virus grippal à partir des sécrétions naso-pharyngées de certains d'entre eux (Fa...). Il est donc incontestable que des affections grippales typiques peuvent, chez un certain nombre de sujets, ne pas être accompagnées de réactions sérologiques caractéristiques.

Ajoutons ici, à titre de simple remarque, que dans un cas de grippe typique accompagnée de manifestations méningées, le liquide céphalo-rachidien du malade n'a renfermé à l'examen ni antigène, ni anticorps de nature grippale

ANALYSE DES RÉSULTATS. — L'examen détaillé des résultats de nos recherches permet quelques remarques suggestives.

ORIGINE DES SÉRUMS SELON LES LOCALITÉS. — Les sérums que nous avons examinés provenaient des régions géographiques indiquées dans le tableau I.

Il ressort de ce tableau que le spectre antigénique de l'épidémie a été sensiblement le même dans les différentes régions d'où provenaient les sérums examinés, et que la vague épidémique présente de ce fait, comme on pouvait s'y attendre, une remarquable homogénéité.

Il ne faut guère s'étonner de voir que les régions qui ne nous

TABLEAU I.

	A	FM	AFM	NÉGATIFS	TOTAL
Paris	1	9	24	32	69
Lyon			6	11	17
Praz-Coutant (Haute-Savoie)			3	7	10
Strasbourg				11	11
Cherbourg			1	2	3
Evreux			1	1	2
Nantes				2	2
Marseille		1	3	1	5
Nevers				3	3
Bâle (D ^r H. Baur)		1	6	8	15
Genève (D ^r J. Wirth)			14	7	21

ont envoyé qu'un petit nombre de sérums, comme Nantes et Nevers, ne nous aient fourni que des sérums dont les résultats étaient négatifs ; il s'agit dans ces cas de sujets pour lesquels le diagnostic posé par le clinicien demeurait hésitant, et à propos duquel on envisageait en dernière analyse, et par élimination, l'hypothèse manifestement improbable d'une affection grippale. De fait, lorsque nous avons pu obtenir ultérieurement des renseignements cliniques, de tels cas concernent presque toujours des malades atteints d'affections fébriles diverses telles que sinusite, broncho-pneumonie, voire fièvre typhoïde.

Au contraire, les médecins, comprenant l'intérêt des recherches sérologiques, qui nous ont envoyé un nombre élevé de sérums, les ont presque toujours prélevés sur des sujets effectivement atteints de grippe.

Le tableau I ne représente donc pas l'incidence relative de la grippe en différentes localités de France, mais simplement le degré d'intérêt que tel clinicien ou tel laboratoire français ou suisse a bien voulu prendre à nos recherches (1).

ORIGINE SUIVANT LES GROUPEMENTS ET COLLECTIVITÉS. — Un certain nombre de sérums proviennent de cas de grippe, prélevés par des confrères dans leur clientèle privée.

(1) Il nous est agréable à ce sujet de remercier tout particulièrement notre élève et collaborateur, le D^r Wirth, de Genève, qui a bien voulu nous envoyer de nombreux sérums dans des conditions toujours impeccables et grâce à qui nous avons pu, en outre, examiner l'évolution ultérieure de la courbe sérologique des malades. Au plus fort de l'épidémie, alors que notre service menaçait d'être matériellement débordé par le nombre des examens à pratiquer, le D^r Wirth a bien voulu nous prêter temporairement son assistant, M^{lle} Vidoudez, qui, tout en s'initiant aux techniques du laboratoire, a participé à ces travaux avec une conscience dont nous lui demeurons reconnaissants.

Le plus grand nombre (les 2/3) provient au contraire de collectivités ou de groupements d'individus frappés par l'épidémie, et ont été prélevés presque simultanément.

L'intérêt des sérums recueillis dans de telles conditions est évident, car ils doivent constituer un sondage assez fidèle des réactions à l'épidémie d'une collectivité donnée.

Nous avons ainsi pu réunir les examens portant sur les collectivités suivantes :

TABLEAU II.

	A	FM	AFM	NÉGATIFS	TOTAL
Crèche (Seine)		2	1	1	4
Préventorium (Seine-et-Marne)		4	7		11
Sanatorium (Haute-Savoie)			3	7	10
Hôpitaux parisiens			3	10	13
Hôpitaux militaires			13	19	32
Asile d'aliénés (Genève)			9	2	11
Institut Pasteur (Paris)	4	1	7	19	31

L'examen du tableau II suggère les remarques suivantes : les collectivités fermées d'où proviennent les sérums sont fortement atteintes par la grippe : la proportion des examens positifs atteint 9/11 (asile d'aliénés, Genève), et 11/11 [préventorium de Dammartin (2)].

Par contre, les hôpitaux parisiens ne donnent que 3 examens positifs sur 13, ce qui montre que, là encore, les examens n'ont été jugés utiles qu'à titre de contrôle pour élucider un diagnostic resté douteux.

Une mention particulière doit être réservée aux examens pratiqués à l'Institut Pasteur où l'on voit que 19 examens sont restés négatifs sur 31 pratiqués. Dans un petit nombre de cas, les sérums négatifs concernent des infections qui n'ont pas été de la grippe, mais ont été recueillis, comme nous l'avons dit plus haut, pour servir de témoins. Dans la majeure partie des cas ils concernent, au contraire, des malades cliniquement atteints de grippe, mais n'ayant pas réagi par la formation d'anticorps sériques. De telles observations ont déjà été faites aux Etats-Unis (Finland, Barnes, Meads et Ory [2] ; Rasmussen Jr, Stokes et Smadel [3]).

En ce qui concerne les hôpitaux militaires (3), on remarque

(2) Les sérums provenant du préventorium de Dammartin nous ont été envoyés par le Dr Le François.

(3) Les différents sérums que nous avons reçus provenaient de Lyon (Professeur agrégé Sohier), Cherbourg (Médecin principal Moncourier), Marseille (Médecin colonel Blanc) et du Val-de-Grâce (Médecin colonel Jude).

que tous les sérums examinés appartiennent au groupe AFM ou sont négatifs. Cela tient à ce que les hôpitaux militaires disposant de laboratoires, ils ne nous ont guère envoyé que les sérums pour lesquels il existait un doute quant à l'interprétation des résultats obtenus.

TAUX DES ANTICORPS ET LEUR VARIATION. — I. *Sérums positifs*. — Le taux d'augmentation des anticorps constaté entre les premiers examens (sérum précoce) et les deuxièmes (sérum tardif) donne, lui aussi, lieu à des observations intéressantes selon les types de réponse :

1° *Sujets n'ayant manifesté d'augmentation du taux des anticorps que pour le virus A* (5 sujets). Cette augmentation est :

4 fois de $\times 2$
1 fois de $\times 4$

2° *Sujets n'ayant montré d'augmentation des anticorps que pour le groupe FM* (12 sujets). Cette augmentation est :

2 fois de $\times 2$
6 fois de $\times 4$
3 fois de $\times 8$
1 fois de $\times 16$

3° *Sujets ayant manifesté une élévation du taux des anticorps à la fois pour le virus A et pour le groupe FM* (56 sujets). Cette augmentation est :

a) *Pour le virus A* :

34 fois de $\times 2$ (60,7 p. 100)
15 fois de $\times 4$ (26,7 p. 100)
7 fois de $\times 8$ (12,5 p. 100)

b) *Pour le groupe FM* :

11 fois de $\times 2$ (19,6 p. 100)
15 fois de $\times 4$ (26,7 p. 100)
16 fois de $\times 8$ (28,5 p. 100)
11 fois de $\times 16$ (19,5 p. 100)
3 fois de $\times 32$ (5,3 p. 100)

On voit par ces chiffres que l'augmentation des anticorps a atteint un taux beaucoup plus élevé pour les antigènes du groupe FM que pour le virus A, ce qui met bien en évidence la prépondérance au cours de l'épidémie du type antigénique appartenant à ce groupe.

Néanmoins, lorsque l'augmentation a été faible, elle semble se manifester surtout pour le virus A (34 fois contre 11 fois), vraisemblablement meilleur antigène que les antigènes du groupe FM. L'ensemble de ces constatations semble donc établir

que dans le complexe A + FM que représente la mosaïque antigène du virus en cause, les anticorps pour le virus A apparaissent plus facilement (et peut-être plus précocement) et durent plus longtemps que les anticorps pour le groupe FM. Par contre, le taux atteint par les anticorps du groupe FM est incontestablement plus élevé que celui atteint par ceux dus au virus A, prouvant ainsi une spécificité plus étroite de cet antigène dans l'épidémie.

Il y a lieu de remarquer que lorsque les examens ont porté sur des sérums de nourrissons, les taux rencontrés se sont toujours montrés beaucoup plus bas que chez l'adulte, ce qui peut s'expliquer soit par la moindre aptitude des nourrissons à former des anticorps, soit parce que, par suite de l'absence d'anticorps résiduels découlant d'affections antérieures, l'épidémie en cause ne jouait pas comme chez l'adulte le rôle d'injection de rappel. Nous considérons par conséquent que chez le nourrisson une élévation quelle qu'elle soit du taux des anticorps sériques doit être considérée comme caractéristique.

PERSISTANCE DES ANTICORPS. — Nous avons pu, dans quelques cas, réexaminer à plusieurs reprises des sujets qui avaient montré, lors du premier examen d'un sérum tardif, une élévation du taux des anticorps par comparaison avec le sérum précoce. De nouveaux examens ont pu être pratiqués dans 13 cas :

a) 5 fois il n'a pas été constaté de modification du taux des anticorps, quel que soit le nombre des examens pratiqués (jusqu'à quatre examens nouveaux), à partir du quinzième jour (1 cas) jusqu'au cent cinquième jour ;

b) Une fois nous avons observé une élévation du taux des anticorps entre le seizième et le quatre-vingt-cinquième jour ;

c) 7 fois une diminution du taux des anticorps, qui a été notée le trente-quatrième jour (1 cas) et le quatre-vingt-cinquième jour (6 cas).

Il en résulte que, dans l'ensemble, le taux des anticorps atteint au cours de l'infection se montre sensiblement constant au moins jusqu'au quatre-vingtième jour, et qu'au delà il commence à diminuer chez la moitié environ des sujets atteints.

Si on analyse, comme nous l'avons fait, la catégorie d'antigènes pour laquelle on observe la baisse la plus marquée des anticorps, on constate que les anticorps n'ont diminué que 4 fois seulement pour le virus A et que cette diminution a dans tous les cas été d'un tube seulement (diminution de moitié), alors que pour le groupe FM, la diminution du taux des anticorps s'observe 9 fois sur 12 et que cette diminution peut dans quelques cas aller jusqu'à 4 tubes (16 fois moins d'anticorps pour la souche PL par exemple).

Il en résulte que les virus du groupe FM sont incontestable-

ment de moins bons antigènes que les virus A et que la diminution du taux des anticorps, lorsqu'elle survient, porte d'abord sur la fraction FM des anticorps lorsque ceux-ci sont complexes (anticorps AFM).

II. *Sérums négatifs.* — Les sérums négatifs sont, par définition, ceux sur lesquels il n'est pas observé d'élévation du taux des anticorps entre le premier et le deuxième prélèvement de sérum (sérum précoce et sérum tardif) effectués à huit ou dix jours d'intervalle au cours de la maladie fébrile.

L'examen de ces sérums ne suggère que deux remarques :

1° D'une manière générale, le taux des anticorps préexistants A ou B rencontrés dans les sérums est résultant soit d'infections ultérieures, soit d'infections latentes, se montre beaucoup plus élevé pour le virus A que pour le virus B, étant bien entendu que les antigènes A (PR8) et B (Lee) employés dans la réactions, présentaient des taux d'hémagglutination comparables. Les anticorps préexistants du groupe FM se sont en général montrés présents en très petite quantité, voire totalement absents.

Il en résulte que l'immunité préexistante de la population paraît ainsi être beaucoup plus accusée vis-à-vis du virus A que vis-à-vis du virus B et que les virus du groupe FM ayant un moindre taux d'anticorps préexistants sont soit de moins bons antigènes, soit d'apparition récente.

2° Comme nous l'avons fait remarquer, il est évident, d'autre part, que parmi les sujets demeurés négatifs, il en est qui étaient authentiquement atteints d'infection grippale, ainsi que le prouve par ailleurs l'isolement des souches à partir de leurs sécrétions.

On pouvait se demander si chez de tels sujets il s'agit simplement d'un retard dans l'apparition des anticorps ou d'une absence complète de production d'anticorps.

Nous avons, pour éclaircir ce point, suivi l'évolution du sérum de 3 sujets ayant présenté un syndrome cliniquement qualifié de grippe, appartenant à des groupes ou collectivités où au même moment un syndrome analogue a déterminé chez d'autres individus l'apparition d'anticorps typiques. Réexaminé après neuf, douze, seize, cinquante-sept, quatre-vingt-un ou quatre-vingt-cinq jours, le sérum de ces sujets est demeuré constamment négatif. On peut en conclure seulement que les individus n'ayant pas réagi au cours de la période fébrile ne paraissent pas non plus réagir ultérieurement par une augmentation retardée des anticorps sériques.

II. — ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES EN CAUSE.

1° *Technique.* En même temps que nous recevions pour examen les sérums qui ont donné les résultats rapportés plus

haut, nous recueillions nous-mêmes ou nous recevions de différents confrères des hôpitaux un certain nombre d'échantillons de lavages de gorge destinés à la recherche du virus.

78 gargarismes de malades ont été ainsi reçus dont 57 accompagnés de deux échantillons de sérums précoce et tardif du même malade et 21 pour lesquels un seul échantillon de sérum a pu être recueilli ; 6 de ces lavages de gorge ont été éliminés pour des raisons diverses (prélèvements trop tardifs ou sujets atteints d'une infection manifestement non grippale), de sorte que nos recherches ont porté sur les échantillons provenant de 72 sujets. Certains de ces échantillons ont fait l'objet de tentatives immédiates d'isolement, soit sur le furet (une souche), soit sur œufs de poule incubés.

En majeure partie, néanmoins, en raison de l'afflux des examens aussi bien que du manque temporaire d'œufs fécondés dont nous avons souffert, les prélèvements ont été congelés et conservés à la température de -24°C puis examinés ultérieurement. Il y a lieu de remarquer du reste que cette manière de procéder, loin de nuire aux isolements, semble au contraire favoriser la récupération du virus puisque, dans l'ensemble, les échantillons ayant subi une congélation prolongée nous ont fourni une proportion de résultats positifs supérieure à celle des prélèvements examinés à l'état frais. Notre expérience sur ce point confirme donc les observations faites par Panthier, Cateigne et Hannoun [4], qui ont constaté, avec les liquides allantoïques, que la conservation à basse température constituait un facteur de sélection du virus.

Par contre, les prélèvements qui ont été expédiés par la poste et qui ont de ce fait voyagé vingt-quatre à quarante-huit heures, ont manifestement fourni un moindre pourcentage de résultats positifs que les autres. On peut en conclure qu'en cas de transfert à distance la congélation immédiate du produit prélevé serait une pratique recommandable.

En dehors de quelques souches qui ont été isolées à partir de prélèvements individuels, nous avons groupé les lavages de gorge reçus en réunissant ensemble dans un lot commun (pool) les lavages appartenant à des sujets provenant de la même région ou de la même communauté et ayant présenté les mêmes réponses sérologiques à la recherche des anticorps.

Les isolements ont été faits selon la technique aujourd'hui classique consistant à inoculer dans le sac amniotique de l'œuf incubé l'échantillon à examiner, additionné d'une faible quantité de pénicilline (50 unités par centimètre cube). Quarante-huit heures après, le liquide prélevé était immédiatement examiné du point de vue de son pouvoir agglutinant sur les hématies de poule, et des passages effectués sur d'autres œufs par voie amnio-

rique ou allantoïde, même si ce premier examen était négatif. Un second et un troisième passages étaient de même effectués, les passages aveugles étant habituellement arrêtés au quatrième. Pour les passages présentant une agglutination positive titrée sur hématies de poule et de cobaye, la transmission d'œuf à œuf est continuée et s'accompagne habituellement d'une adaptation brusque au liquide allantoïque.

Il y a lieu de remarquer à ce point de vue que parmi les souches isolées nous avons observé d'assez grandes différences dans l'aptitude à l'adaptation allantoïque. Certaines souches, l'une en particulier du type A, se sont immédiatement adaptées dès le second passage à l'allantoïde donnant une culture abondante d'un taux élevé, alors que d'autres souches, dont la souche n° 1 ou souche PL, du groupe AFM, continuent encore à l'heure actuelle à montrer un faible taux de croissance dans l'allantoïde et une préférence manifeste pour le liquide amniotique.

Dans les conditions ci-dessus nous avons isolé au total 10 souches du virus grippal de la présente épidémie.

Rappelons qu'en même temps que nous obtenions notre première souche, Panthier, Cateigne et Hannoun [5], dans le laboratoire de Dujarric de la Rivière, isolaient de leur côté une souche dénommée D. 48, et que Wirth, de son côté, réussissait un isolement analogue à Genève. Enfin, rappelons également que la première souche que nous ayons isolée, désignée au laboratoire sous le nom de souche PL₁, l'a été à partir d'un lavage de gorge de l'un de nous, et que des échantillons du même lavage ont permis en Angleterre au Prof. C. H. Andrewes d'une part, et au Dr Dudgeon d'autre part, d'isoler la même souche, qui selon la classification de Andrewes est dénommée : A/Paris (PL) 1/49.

2° ETUDE DES SOUCHES. — Les 10 souches que nous avons isolées ont été numérotées dans l'ordre d'enregistrement et dési-

DÉNOMINATION du laboratoire	TYPE ANTIGÉNIQUE	NOMENCLATURE selon Andrewes
1. P. L... (1)	AFM	A/Paris (PL) 1/49
2. Mau... (2)	FM	A/Paris (PL) 2/49
3. Cril... (3)	A	A/Paris (PL) 3/49
4. Chantal (4)	A	A/Paris (PL) 4/49
5. Ba... (5)	A	A/Paris (PL) 5/49
6. Co... (6)	FM	A/Paris (PL) 6/49
7. Nou... (7)	A	A/Paris (PL) 7/49
8. Fa... (8)	A	A/Paris (PL) 8/49
9. Wa... (9)	A	A/Paris (PL) 9/49
10. Ch... (10)	A	A Paris (PL) 10/49

gnées pour la commodité par le nom du malade à partir duquel elles ont été isolées (4).

Dans l'énumération ci-dessous, elles sont désignées à gauche par leur dénomination courante au laboratoire, et, à droite, par la dénomination qu'il convient de leur appliquer en suivant la nomenclature proposée par C. H. Andrewes.

D'après leur identification au moyen des immun-sérums spécifiques (sérums de lapins et parfois de furets), on voit que ces souches se répartissent suivant leurs types de la manière suivante :

TYPE	NOMBRE	NUMÉRO DE LA SOUCHE
A.	7	(3), (4), (5), (7), (8), (9), (10)
FM.	2	(2), (6)
AFM.	1	(1)
B.	0	

Différentes d'après leur type antigénique, ces souches l'ont été également d'après leur comportement, ainsi que le montre l'étude de leurs caractères :

a) *Moment de l'apparition du pouvoir agglutinant pour les hématies de poule ou de cobaye.* — Le moment où apparaît l'hémagglutination positive après isolement et passage par voie amniotique s'est montré très variable d'une souche à l'autre. Dans tous les cas, lorsqu'on opère avec une souche récemment isolée, l'hémagglutination obtenue est au début plus franche et plus caractéristique sur les globules de poulet que sur les hématies de cobayes, mais ces dernières, par leur sédimentation plus lente, donnent des réponses plus nuancées et sont précieuses pour confirmer les résultats.

b) *Taux d'agglutination obtenus.* — Là encore, les taux obtenus, et qui se maintiennent après un nombre parfois élevé de passages sur les liquides de l'œuf, varient beaucoup d'une souche à l'autre. Le comportement des souches que nous avons isolées semble être du reste en relation avec leur type antigénique. Si on les classe d'après ce caractère on observe en effet que les taux d'agglutination obtenus dès les premiers passages (quatrième ou cinquième) avec nos souches sont les suivants :

Souches A :

1 souche agglutine à	1/1.280
1 souche agglutine à	1/2.560
4 souches agglutinent à	1/5.120
1 souche agglutine au delà.	

(4) L'étude du pouvoir pathogène de ces souches pour l'animal fera l'objet d'un autre travail.

Souches FM :

1 souche agglutine à	1/1.280
1 souche agglutine à	1/2.560

Souche AFM :

Ne dépasse pas	1/640
--------------------------	-------

Enfin, et c'est là peut-être le caractère le plus important, qui montre à la fois que toutes les souches isolées appartiennent à un même groupe général, mais qu'elles sont constituées par une mosaïque d'antigènes, les souches que nous avons isolées n'ont pas nécessairement coïncidé dans leur caractéristique antigénique avec les réponses sérologiques données par les malades de qui elles étaient originaires. Les souches se répartissent en effet ainsi par rapport aux malades d'où elles proviennent :

- 1° *Grippés ayant des anticorps du type A* : 1 souche FM ;
- 2° *Grippés ayant des anticorps du groupe FM* : 2 souches A ;
- 3° *Grippés ayant des anticorps AFM* : 1 souche AFM, 1 souche FM ;
- 4° *Grippés n'ayant montré aucun anticorps* : 3 souches A ;
- 5° *Grippés pour lesquels il n'a pas été obtenu de sérum* : 2 souches A.

Nous donnons enfin, ci-après, les caractéristiques particulières à chacune de nos souches lors de leur isolement.

1° SOUCHE PL. — Obtenue à partir d'un mélange de lavages de gorge prélevés sur un même malade aux dates des 12 et 13 janvier 1949. Les lavages se sont par ailleurs montrés pathogènes pour le furet. Cette souche est isolée par passage direct intra-amniotique. Au premier passage elle donne une agglutination, sur hématies de cobayes seulement et avec le liquide amniotique. Au second passage on obtient un titre amniotique et allantoïque de 1/320. Au troisième passage, le virus est adapté à l'allantoïde. Les passages ultérieurs relèvent, mais faiblement, le taux d'agglutination. Le titre dans l'allantoïde ne dépasse que rarement 1/640, la culture étant faite à la température de 32°. A 38° C, ce virus ne pousse pas (agglutination = 0).

Les furets inoculés avec le virus développent dans leur sérum des anticorps à la fois pour le virus A (PR 8) et pour la souche FM₁. Le taux d'inhibition spécifique du sérum de furet est le même avec les antigènes standards PR 8 et FM₁ : 1/320. Il s'agit d'un virus AFM, comme le montre la recherche du type antigénique pratiquée à plusieurs reprises avec les antigènes amniotiques ou allantoïdes.

Type antigénique
(établi sur cinq antigènes amniotiques ou allantoïdes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee.	Barrett	FM ₁	PL
Titres d'inhibition des antigènes.	1/320	0	1/2 560	1/1.280	1/2.560
	à 1/1.280				

La souche est donc bien AFM.

2° SOUCHE MAU... — Obtenue à partir d'un mélange de trois lavages de gorge, les malades ayant tous des anticorps pour le virus A. L'analyse ultérieure des produits d'origine a montré que la virulence provenait du malade Mau...

L'agglutination devient positive au troisième passage. L'adaptation à l'allantoïde ne se fait qu'après le quatrième passage sur amnios. Le taux atteint alors : allantoïde 1/2.560, amnios 1/1.280. Par titrage de l'effet empêchant des sérums standards on obtient :

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee	FM ₁
Titres d'inhibition des antigènes.	1/40	0 ou 1/40	1/ 2560

3° SOUCHE GRIL... — Origine : mélange de lavages de gorge de 4 malades parisiens dont aucun n'a montré, ni au cours de la grippe, ni ultérieurement, d'élévation du taux des anticorps. Le passage est fait sur amnios, les premier et deuxième passages ne montrant pas d'agglutination. L'agglutination devient positive faible avec le liquide amniotique, au troisième passage. On obtient au quatrième passage : allantoïde 1/320, au cinquième passage : allantoïde 1/5.120.

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérums standards anti	PR 8	Lee.	Barrett.	PL
Titres d'inhibition des antigènes.	1/5.120	0	1/160	1/160
	(1 fois : 1/10.240).	ou 1/40		

4° SOUCHE CHANTAL. — Mélange de deux lavages de gorge d'une crèche parisienne dont les malades ont montré des anticorps du groupe FM. L'agglutination est positive dans l'amnios au deuxième passage ; au troisième passage, allantoïde : 1/640. Le titre augmente ensuite pour atteindre au sixième passage 1/5.120.

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee	F ₁
Titres d'inhibition des antigènes.	1/1 280	1/160	1/160

5° SOUCHE BA... — Origine : Hôpitaux parisiens. Il s'agit d'un lavage de gorge envoyé sans le sérum correspondant du malade. Agglutination positive dans l'amnios au troisième passage. Quatrième passage : allantoïde : 1/2.560.

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee	Barrett	PL
Titres d'inhibition des antigènes.	1/5 120 et 1/10 240	1/80 et 1/160	1/40 et 1/160	1 40 et 1/160

Il s'agit d'une souche A typique.

6° SOUCHE Co... — Malade du Havre dont la formule sérologique est AFM. Agglutination faible dans l'amnios au troisième passage ; quatrième passage : allantoïde, 1/320 ; cinquième passage : allantoïde, 1/1.280.

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee	Barrett	PL
Titres d'inhibition des antigènes.	0 et 1/40	0 et 1/40	Jusqu'à 1/20 480	Jusqu'à 1/10 240

Il s'agit d'une souche FM typique.

7° SOUCHE Nou... — Mélange de deux lavages de gorge de grippés dont la formule sérologique est FM. Agglutination positive dans l'amnios au troisième passage ; quatrième passage : allantoïde, 1/2.560 ; cinquième passage, 1/5.120.

Type antigénique (établi sur trois antigènes).

Sérums standards anti :	PR 8	Lee	Barrett	PL
Titres d'inhibition des antigènes	1/2 560	1/80	1/40	1/160

8° SOUCHE Fv... — Malade de l'Institut Pasteur dont le sérum n'a permis de mettre en évidence aucun anticorps malgré de mul-

tiples examens. Le lavage de gorge donne, au premier passage, une agglutination amniotique positive. L'agglutination dans l'allantoïde atteint au cinquième passage 1/1.280 et au sixième passage 1/5.120.

Type antigénique (établi sur quatre antigènes).

Sérum standards anti Titres d'inhibition des antigènes.	PR 8 1/2 560	Lee 1/80	PL 1/80
------------------------------------------------------------	-----------------	-------------	------------

9° So CHE WA... — Un groupe d'œufs est inoculé avec des lavages de gorge de 11 grippés dont 9 de l'Institut Pasteur et 2 de Cherbourg, malades dans le sérum desquels il n'a pu être mis en évidence aucun anticorps.

Au premier passage, six des liquides amniotiques individualisés donnent naissance à une agglutination faible, douteuse. De nouveaux passages sont effectués avec chacun des liquides amniotiques et demeurent sans résultat, sauf pour deux d'entre eux, provenant de malades de l'Institut Pasteur, qui donnent une agglutination faible au troisième passage. Ces deux liquides amniotiques sont mélangés et au quatrième passage on voit apparaître une agglutination franchement positive, non titrée, avec le liquide amniotique.

Au cinquième passage, le titre atteint 1/1.280 et s'y maintient jusqu'au neuvième passage.

Type antigénique (établi sur huit antigènes).

Sérum standards anti : Titres d'inhibition des antigènes.	PR 8 1/2 560	Lee 1/80 à 1/160	PL 1/40 à 1/80
--------------------------------------------------------------	-----------------	---------------------	-------------------

10° SOUCHE CH... — Origine : un malade de l'Institut Pasteur pour lequel il n'a pas été recueilli de deuxième sérum. Au deuxième passage sur amnios, agglutination positive. Troisième passage : allantoïde, 1/1.280 ; cinquième passage : allantoïde, 1/5.120.

Type antigénique (établi sur onze antigènes).

Sérum standards anti : Titres d'inhibition des antigènes.	PR 8 1/2 560 à 1/5 120	Lee 1/40	Barrett 1/40 à 1/ 0	PL 1/80
--------------------------------------------------------------	------------------------------	-------------	---------------------------	------------

En résumé, si nous groupons les caractéristiques des souches

isolées selon leurs réponses aux différents types antigéniques. nous voyons qu'elles forment ainsi un éventail à peu près complet allant graduellement du type A pur (souche Ba...) au type FM pur (souche Co...) en passant par le type AFM (souche PL) où les deux antigènes se rencontrent en parties égales.

D'autre part, nous constatons également que le type antigénique prédominant dans les virus isolés ne correspond pas nécessairement à celui pour lequel le malade développe un taux maximum d'anticorps.

Ces constatations confirment une fois de plus l'étroite imbrication existant entre les souches du groupe FM et le virus A typique. S'il est indiscutable que les souches du groupe FM sont antigéniquement reliées au virus A, ces souches ne peuvent néanmoins pas être considérées uniquement comme un sous-groupe du virus A puisque les anticorps du groupe FM peuvent apparaître soit parallèlement aux anticorps A, soit indépendamment d'eux.

Signalons pour terminer que cette pluralité antigénique se retrouve sur les 5 souches romaines que le Professeur Babudieri a bien voulu nous adresser et qui se comportent dans l'ensemble comme nos propres souches, en particulier la souche PL.

De la sorte, nos constatations soulignent, d'une part, la richesse de la palette antigénique des virus appartenant au groupe A et, d'autre part, établissent, du point de vue épidémiologique, l'unité du virus grippal qui a sévi sur l'Europe pendant l'hiver 1948-1949.

Nous avons dans une première note [6] fait ressortir la parenté de ce virus avec les souches isolées en 1947, soit en Grande-Bretagne (souche Barrett), soit en Suède (souche Gg), souches elles-mêmes apparentées à la souche FM₁, d'origine américaine, identifiée en 1947.

Comment expliquer à la fois cette analogie et ces différences ?

Le comportement si discordant par rapport au virus A de toutes ces souches apparentées au virus FM₁ n'aurait pas manqué de frapper les chercheurs si le virus avait été rencontré avant 1947.

La parenté qu'offrent entre eux ces virus avec la souche A et les différentes souches que l'on rencontre au sein même du groupe FM, virus représentés par les souches FM₁, Barrett, Gg, nos propres souches, celles de Carlinfantini [7], de Babudieri et de Wirth, souches qui, tout en présentant entre elles une évidente proximité, montrent néanmoins des différences significatives, semble en faveur d'une mutation ou tout au moins d'une évolution actuelle du virus A.

Signalons enfin que le fait que des cas isolés de grippe aient en 1947 permis l'isolement de souches du groupe FM en Grande-Bretagne et en Suède, semble avoir protégé ces pays contre l'épidémie qui a fait cet hiver, à travers l'Europe, un grand

nombre d'atteintes heureusement bénignes dans l'ensemble. Ce fait est de nature à confirmer les observations de Salk et de Francis établissant que l'état d'immunité d'un nombre relativement restreint d'individus dans une communauté suffit souvent à protéger l'ensemble du groupe contre les manifestations épidémiques de la grippe.

CONCLUSIONS.

L'étude à laquelle nous avons procédé confirme et précise les conclusions de nos recherches préliminaires :

1° Les réactions sérologiques des malades comme l'étude du virus (10 souches isolées) au cours de la récente épidémie de grippe montrent que le virus en cause présente chez l'ensemble des sujets les mêmes caractéristiques générales qui permettent d'attribuer l'épidémie à un virus appartenant au groupe général des virus du type A.

2° Il existe néanmoins des différences marquées dans le comportement, le type antigène et la réponse sérologique des souches isolées, l'ensemble de ces souches présentant toute une gamme de caractères allant des souches A typiques aux souches FM typiques.

3° Ce caractère donne à penser que l'on assiste actuellement à une évolution des souches du type A, sans que l'on puisse dire s'il s'agit là d'un virus en perpétuelle évolution ou du passage, en cours de réalisation, d'un type de virus à un autre.

4° Un nombre important de sujets semble ne pas réagir à l'infection grippale par la formation d'anticorps sériques, bien que présentant des manifestations cliniques de la maladie. Il est néanmoins possible d'isoler des souches grippales chez ces malades, sans que l'on puisse dire si la proportion des souches isolées chez ces sujets est aussi élevée que chez les sujets ayant présenté des réactions de type sérologique classiques.

5° Les souches appartenant au groupe FM se montrent de moins bons antigènes que les souches A typiques, bien que les taux d'anticorps sériques déterminés par l'antigène FM aient été plus élevés à la période aiguë que les taux déterminés par le virus A. Ce dernier provoque des anticorps persistant plus longtemps que les anticorps FM dont le taux commence à diminuer avant celui des anticorps A.

6° Dans l'ensemble, les taux d'anticorps déterminés chez les malades ont atteint leur maximum dès la seconde semaine après l'infection et persistent à ce niveau au moins jusqu'au quatre-vingtième jour. Il n'y a pas d'apparition tardive des anticorps. La disparition précoce de ces derniers est exceptionnelle.

7° Nos observations confirment, tant du point de vue des réac-

tions sérologiques que des virus isolés, que le virus B n'a pris aucune part à l'épidémie étudiée.

8° Du point de vue technique, la congélation préalable et le stockage des lavages de gorge à la température de -24° paraissent nettement favoriser l'isolement ultérieur des souches par inoculation directe dans l'amnios de l'œuf de poule incubé. Avec les virus fraîchement isolés, les réactions d'hémagglutination sont plus précocement et plus franchement positives lorsque cette réaction est recherchée au moyen des hématies de poule, mais les suspensions d'hématies de cobaye sont particulièrement utiles pour trancher les cas douteux. Les hématies humaines présentent le même avantage.

En règle générale, l'adaptation allantoïque des souches a été obtenue avec nos souches dès le quatrième passage sur l'œuf. Les caractères antigéniques des souches se sont maintenus au cours des passages ultérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.) et REINIÉ (L.). Ces *Annales*, 1946, **72**, 532.
- [2] FINLAND (M.), BARNES (M. W.), MEADS (M.) et ORY (E. M.). *J. Lab. a. clin. Med.*, 1948, **32**, 15-30.
- [3] RASMUSSEN Jr (A. F.), STOKES (Julia C.) et SMADEL (Jos. E.). *Am. J. Hyg.*, 1948, **47**, 142-149.
- [4] PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1472.
- [5] PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 72.
- [6] LÉPINE (P.), SAUTTER (V.), REINIÉ (L.) et MAURIN (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 66.
- [7] CARLINFANTI (E.), PONTECORVO (M.) et BENZONI (G.). *Riv. Istituto Sieroter. Italiano. Sez. II*, 1948, **23**, 148.

CONSIDÉRATIONS BIOCHIMIQUES SUR LE MODE D'ACTION DE LA PÉNICILLINE

par FRANÇOIS GROS et M. MACHEBOEUF

(avec la collaboration de ULF RAMBECH et COLETTE LATERRADE).

(Institut Pasteur. Service de Chimie microbienne.)

Dans un premier travail, nous avons montré que la pénicilline inhibe la libération d'acide phosphorique à partir de l'adénosine triphosphate (A. T. P.) par des suspensions de *Clostridium sporogenes* non proliférant [1] sans intervenir sur les transphosphorylations du domaine glucidique.

Peu après, nous avons constaté que la pénicilline inhibe également le catabolisme d'autres ribonucléotides (acide adénylique, acide guanylique) [2, 3].

A la même époque, Krampitz et Werkman, en Amérique [4], ont constaté que la pénicilline inhibe la consommation d'oxygène pendant l'oxydation du ribose de composés ribonucléiques par des suspensions de staphylocoques préalablement déshydratés (1).

Nous avons montré, par la suite [3], que la consommation du ribose nucléique et nucléotidique par une bactérie *anaérobie stricte* (*Cl. sporogenes*) vivante non proliférante est inhibée par la pénicilline.

Depuis lors, ont paru plusieurs travaux confirmant l'interférence entre pénicilline et métabolisme ribonucléique. Exemples : 1° Boivin et al. constatent [5], chez des cellules soumises à l'action de la pénicilline, une forte diminution de la basophilie du cytoplasme qui perd en outre sa capacité de bipartition tandis que les noyaux continuent à se diviser ; 2° Vendrely [6], puis Gale [7], étudiant des bactéries croissant en présence de doses subléthales de pénicilline, notent que la synthèse de l'acide ribonucléique est freinée ; 3° Dufrénoy et Pratt [8], puis Bellamy et Klimek [9], observent que les staphylocoques traités par la pénicilline perdent leur caractère Gram-positif que l'on a attribué (Henry et

(1) Le *d*-ribose lui-même, le ribose 5-phosphate, ainsi que le ribose des mononucléotides puriques ne sont pas consommés par le staphylocoque dans ces conditions. D'autre part, la pénicilline n'inhibe pas la désintégration des composés à désoxyribose.

Stacey [40]) à un complexe protéine-acide ribonucléique-magnésium. D'ailleurs, les staphylocoques devenus *pénicillinorésistants* présentent des parties Gram-négatives [9].

Dès lors, on peut se demander quelle est l'étape du métabolisme ribonucléique sensible à la pénicilline. On doit en outre chercher comment l'action sur ce métabolisme peut rendre compte des divers troubles biochimiques que la pénicilline apporte aux autres processus métaboliques des microbes.

Des hypothèses ont été émises sur ce point :

Frieden et Frazier [41] ont pensé que la pénicilline agirait sur la ribonucléase. Massart [42] a même cru observer que la pénicilline détruisait l'activité de la ribonucléase, mais le substrat utilisé dans ses expériences était simplement une suspension de cellules de levures et le critère d'action de la ribonucléase était un simple examen histologique peu spécifique.

Nous avons repris le problème en mettant en œuvre de la ribonucléase cristallisée et de l'acide ribonucléique très purifiés et nous avons constaté que *la pénicilline est sans aucune action sur la dépolymérisation de l'acide ribonucléique par la ribonucléase* [43].

Nous sommes bien certains que le métabolisme des polynucléotides à ribose est inhibé par la pénicilline ; nos expériences sur ce point sont très concluantes [3], mais nous pensons que cette inhibition résulte de l'inhibition de la dégradation des *mononucléotides* que nous avons mise en évidence d'autre part. La pénicilline bloquant la lyse des *mononucléotides*, maintient ceux-ci intacts dans le système et freinerait ainsi la dépolymérisation de l'acide ribonucléique soit par simple action de masse (2), soit par inhibition indirecte de la ribonucléase (cette inhibition de l'enzyme par les mononucléotides a été effectivement constatée par Zittle [44].

Le problème principal consiste, selon nous, à déterminer sur quel processus du catabolisme des mononucléotides agit l'antibiotique.

Le premier mononucléotide dont nous avons noté la protection par la pénicilline était l'A. T. P. [4] (expériences effectuées avec des suspensions de *Clostridium sporogenes* non proliférant). On pouvait penser à une action sur l'A. T. P. base de la bactérie. Nous avons donc cherché si la pénicilline inhibait l'activité des systèmes enzymatiques, dépourvus de cellules, qui déphosphorylent l'A. T. P. et les mononucléotides : 1° dans un premier

(2) Schmidt et al. [47] ont montré que la ribonucléase ne produit pas seulement, comme on le pensait, la coupure des polynucléotides en tétranucléotides, mais libère des mononucléotides. On conçoit donc que des mononucléotides puissent, par action de masse, freiner la réaction.

travail nous avons vu que les extraits de muscles déphosphorylent l'A. T. P. aussi bien en présence de pénicilline qu'en l'absence d'antibiotique [45]; 2° nous constatons aujourd'hui que la pénicilline est dépourvue d'effet vis-à-vis de la mononucléotidase intestinale agissant sur des mononucléotides purifiés ou pyrimidiques purifiés pris isolément ou mélangés. L'enzyme fut préparé selon Alberts [46]. Voici à titre d'exemples deux de nos expériences :

Première expérience. — Essai portant sur de l'acide adénylique purifié. Les chiffres sont donnés en microgrammes d'ions phosphoriques trouvés après des durées de contact diverses dans 1 ml. d'un mélange qui contenait 2 mg d'acide adénylique et 20 microgrammes de notre préparation enzymatique. La température était 40° C ; le pH était 7,5 (tampon boraté 0,035 M). La dose de pénicilline éprouvée ici était considérable : 1.000 U. O. par millilitre. Les dosages d'ions phosphoriques furent effectués par la méthode de Briggs [48].

	DURÉE DE L'EXPÉRIENCE			
	Départ	1 heure	3 heures	6 heures
Sans pénicilline .	44	42	56	64
Avec pénicilline .	44	34	56,5	72

Deuxième expérience. — Essai portant sur un mélange de nucléotides. Chaque millilitre contenait un total de 2 mg. de nucléotides purifiés (acide adénylique, acide guanylique, acide cytidilique et acide uridylique en quantités égales), en présence de 20 microgrammes d'enzyme par millilitre. Dans cette expérience, nous avons fait varier la concentration en antibiotique depuis 1 jusqu'à 1.000 unités par millilitre de mélange. Les résultats sont donnés en microgrammes d'ions phosphoriques présents après quatre-vingt-dix minutes à 40° C à pH 7,5 (tampon boraté).

	CONCENTRATION EN PÉNICILLINE (unités Oxford par ml.)						
	Témoin sans pénicilline	1	5	20	100	200	1.000
Ions phosphoriques.	90	92	95	85	83	83	90

Nous ne jugeons pas utile de présenter les nombreux chiffres

que nous avons obtenus ; ils confirment tous que la pénicilline n'a pas d'action inhibitrice, même à très haute dose, sur la déphosphorylation des mononucléotides par la mononucléotidase intestinale.

A titre de comparaison, nous avons étudié également d'autres antibiotiques : streptomycine et tyrothricine qui se sont, eux aussi, avérés sans action inhibitrice sur la mononucléotidase intestinale.

A titre de confirmation nous donnerons les conclusions d'expériences encore inédites effectuées avec nous par M^{lle} Colette Lattérade sur le *Staphylococcus albus*. On sait que ce genre possède une mononucléotidase très active [19] et effectivement la pénicilline n'inhibe pas la déphosphorylation des mononucléotides par des suspensions de ce microbe non proliférant.

Puisque la pénicilline inhibe la libération d'ions phosphoriques à partir de l'A. T. P. ou des mononucléotides chez *Clostridium sporogenes* et puisque, comme on vient de le voir, elle n'agit pas sur les phosphatases spécifiques de ces substrats (adénylpyrophosphatases et phosphomonoestérase), on est obligé de penser que chez le *Clostridium*, la production d'acide phosphorique aux dépens des mononucléotides ou de l'A. T. P. ne résulte pas du simple clivage direct de la copule phosphorique, mais d'une chaîne de processus plus complexes. D'ailleurs nous avons constaté que *Clostridium sporogenes*, qui ne renferme que des traces des nucléosides, contient des purines libres en quantité relativement considérable (3).

Il est donc fort probable que le *Clostridium* puisse dégrader les mononucléotides par un processus atypique (comme certains bacilles sporogènes étudiés en 1932 par Mc Fayden [20]. On doit penser au schéma suivant :

- 1° Base-ribose-phosphate base + ribose-phosphate.
- 2° Ribose-phosphate ribose + phosphate.

L'inhibition par la pénicilline du catabolisme des mononucléotides chez le *Clostridium* peut résulter de l'une ou l'autre des actions suivantes :

- a) Inhibition de la coupure entre base et ribose-phosphate.
- b) Inhibition du catabolisme du ribose-phosphate ou du ribose qui en dérive (4).

(3) Cette hypothèse est également soutenue par le fait suivant (DICKENS, 1938 [21]) : des organismes évoluant en anaérobiose (levures) peuvent fermenter le ribose-5-phosphate en libérant CO_2 , H_2O , PO_4H , et une substance indéterminée renfermant deux atomes de C.

(4) A l'appui de cette deuxième hypothèse, on peut peut-être invoquer le fait suivant : les staphylocoques, en devenant pénicillino-résistants, perdent en grande partie leur pouvoir oxydatif vis-à-vis de nombreux substrats glucidiques autres que le glucose [9].

Quoi qu'il en soit de l'intimité de cette inhibition, elle est un fait évident, d'une netteté remarquable, comme le prouvent nos travaux antérieurs et leurs confirmations étrangères. Faut-il voir là le point central de l'action antibiotique de la pénicilline ?

Lorsque la pénicilline agit sur une bactérie, on peut observer des influences sur divers processus biochimiques :

1° Freinage de la lyse bactérienne dans les émulsions non proliférantes [22].

2° Lyse des bactéries en croissance.

3° Inhibition de la réaction de Stickland chez *Clostridium sporogenes* [23].

4° Inhibition de la captation de l'acide glutamique par les staphylocoques [24].

5° Modification du potentiel d'oxydoréduction.

Ces actions sont-elles directes ou indirectes ? L'action sur les nucléotides n'est-elle pas primitive, les autres actions n'étant que des conséquences de l'action sur les nucléotides ?

Les rôles des mononucléotides chez les bactéries sont mal connus. On sait cependant que l'acide adénylique intervient comme cofacteur dans des transphosphorylations glucidiques. Il joue probablement un rôle dans des transphosphorylations accompagnant l'action de certaines déshydrogénases.

Krampitz et Werkman [4], reprenant une hypothèse déjà émise par Richardson, en 1936 [25], attribuent aux nucléotides pyrimidiques un rôle dans certaines phosphorylations inconnues, rôle comparable à celui que joue l'acide adénylique. Cette hypothèse est peut-être valable, mais nous pouvons en tout cas affirmer que l'action de la pénicilline ne porte pas sur l'intervention de nucléotides dans des processus de phosphorylation du métabolisme des hexoses, car ces processus de phosphorylation se sont montrés insensibles à la pénicilline [15].

Envisageons successivement les diverses manifestations de la pénicilline sur les microbes :

I. FREINAGE DE LA LYSE BACTÉRIENNE DANS LES ÉMULSIONS NON PROLIFÉRANTES. — La pénicilline, à concentration suffisante, freine l'autolyse des suspensions non proliférantes de *Clostridium*. Hirsch et Dosogogu [26], sans appui expérimental, admettent également une inhibition des enzymes autolytiques par la pénicilline. Nous avons montré que la pénicilline n'inhibe pas les enzymes protéolytiques du *Clostridium* [27]. Mais on sait (Stacey et Webb [28]) que la première étape de l'autolyse microbienne est une décomposition du complexe ribonucléoprotéique. On peut donc penser que le freinage de l'autolyse par la pénicilline est une conséquence de l'inhibition du catabolisme nucléoprotéique.

On sait que la pénicilline à dose subléthale, agissant sur des

bactéries en croissance, entraîne leur lyse au lieu de la freiner, comme dans le cas des bactéries non proliférantes. Mais la dose de pénicilline est alors très faible. Envisageons ce point :

II. LYSE DES BACTÉRIES EN CROISSANCE. — Le phénomène de lyse est très compliqué et peut relever de causes très diverses encore mal étudiées. La lyse par la pénicilline se produit à un instant précis, après une période de bactériostase. On a pensé, sans argument solide, à une action de la pénicilline sur la tension superficielle. On a pensé à une activation d'enzymes autolytiques inconnus [29]. Les seuls enzymes protéolytiques pour lesquels une activation fut observée sont les dipeptidases [30, 27], mais ces enzymes n'agissent vraisemblablement qu'aux termes ultimes de l'autolyse et, d'ailleurs, Gorini pense que l'activation observée pour les dipeptidases bactériennes est elle-même une résultante de la lyse, cette lyse libérant les peptidases et favorisant ainsi leur action sur les dipeptides. On a pensé (Dufrénoy et Pratt [31]) que le complexe ribonucléo-protéido-magnésien, responsable de la réaction de Gram, était dénaturé par la pénicilline agissant sur les groupes sulphydriques de la protéine. L'argument en faveur de cette hypothèse est la suppression de la coloration Gram chez les bactéries soumises à l'action de la pénicilline à doses subléthales. Notons toutefois que, d'après Panijel [32], le caractère Gram-positif relève de causes nombreuses et pas seulement du complexe ribonucléo-protéido-magnésien. Ici, nous nous trouvons en présence d'un processus trop mal connu pour pouvoir conclure, mais rien ne s'oppose à ce que l'action de la pénicilline sur le métabolisme des mononucléotides soit le phénomène essentiel. En effet, si la cellule est privée de certains dérivés du métabolisme nucléique qui, comme on le sait [33], commande la synthèse des protéines cellulaires, mais conserve intactes ses enzymes protéolytiques (5), l'équilibre ne tarde pas à être rompu en faveur de l'autolyse.

III. INHIBITION DE LA RÉACTION DE STICKLAND CHEZ *Clostridium sporogenes*. — Nous avons observé [22] que la pénicilline inhibe très fortement les oxydoréductions entre aminoacides connues sous le nom de réaction de Stickland s'effectuant chez *Clostridium sporogenes*. Ici semblait se manifester une action de l'antibiotique, indépendante du métabolisme des nucléotides. Mais nous avons pu montrer [34] que des nucléotides jouaient un rôle fondamental, jusqu'alors inconnu, dans la réaction de Stickland. En effet : 1° un

(5) Tous les enzymes protéolytiques que nous avons pu étudier se sont révélés insensibles à la pénicilline [27] ; certains même sont légèrement activés.

nucléotide tel que l'acide adénylique intervient comme cofacteur très actif dans la réaction de Stickland ; 2° la ribonucléase, qui peut libérer des mononucléotides à partir des acides nucléiques du *Clostridium*, suffit à activer, elle aussi, très intensément, la réaction de Stickland.

L'inhibition de la réaction de Stickland par la pénicilline apparaît donc comme une conséquence de l'action de l'antibiotique sur le métabolisme des nucléotides. Il se peut que le nucléotide soit lui-même un cofacteur de la réaction, mais il nous semble plus probable que le cofacteur actif soit un dérivé du mononucléotide ; la pénicilline inhibe, nous le savons, le métabolisme du nucléotide et prive ainsi la réaction de Stickland de la source de son cofacteur.

IV. INFLUENCE DE LA PÉNICILLINE SUR LE POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES CULTURES DE BACTÉRIES. — On soupçonne depuis les travaux de Mulé [35] que la pénicilline influe sur le potentiel d'oxydoréduction dans les cultures de staphylocoques. En effet, quand on place les staphylocoques dans une atmosphère enrichie en oxygène, on favorise l'action de la pénicilline, tandis que l'on parvient à annuler totalement l'action antibiotique en plaçant les bactéries dans de l'hydrogène. Cette question fut reprise tout récemment dans notre Institut par Drouhet et Kepes [36] dont les résultats sont les suivants : la pénicilline à doses subléthales ralentit fortement l'abaissement du potentiel d'oxydoréduction pendant l'évolution de la phase de croissance logarithmique des cultures de staphylocoques. Un autre fait peut être rapproché de ces précédents [9] : des staphylocoques, devenus pénicillinorésistants, ont perdu leur faculté de se développer en anaérobiose.

Trouvons-nous, ici encore, dans ces phénomènes un lien avec l'influence de la pénicilline sur le métabolisme des dérivés nucléiques ? Déjà, depuis 1938, Richardson [25] avait montré que l'uracile favorise grandement le développement des staphylocoques en anaérobiose. D'autre part, on assiste chez les bactéries à une augmentation de la teneur relative en nucléotides pendant la phase de croissance logarithmique, c'est-à-dire au moment de l'abaissement du potentiel redox [37] et de la réalisation des synthèses cellulaires les plus intenses.

Enfin, divers auteurs et surtout Zittle [38] ont montré récemment l'intervention de mononucléotides dans des phénomènes de déshydrogénation enzymatique (inhibition ou activation suivant les cas). Tout ceci fait bien présumer l'existence d'un lien entre l'action de la pénicilline sur le potentiel redox et son action sur le métabolisme des nucléotides.

Cependant la pénicilline agit peut-être, en outre, d'une autre

façon sur les systèmes oxydoréducteurs. Dufrénoy et Pratt [39] pensent qu'elle peut intervenir en réagissant avec des groupements soufrés des protéines ou des peptides actifs comme transporteurs d'H (tels que le glutathion). Mais les arguments, en faveur de cette hypothèse, sont jusqu'ici tirés seulement de l'étude *in vitro* de combinaisons entre la pénicilline d'une part et les thiols simples d'autre part, tels que cystéine et glutathion. Il reste à prouver que la pénicilline agissant sur une cellule vivante ou même sur une simple protéine entraîne une diminution du nombre ou de l'activité de groupes — SH.

Il est fort possible que l'action si importante de la pénicilline sur le métabolisme des nucléotides soit le fait de l'action première de l'antibiotique sur un apoenzyme, un coenzyme ou un effecteur soufré intervenant dans le métabolisme nucléaire. Mais nous voulons attirer l'attention sur trois points : 1° On ne connaît pas de fait appuyant l'hypothèse de la transformation dans la cellule par la pénicilline de groupes — SH — en groupes — S-S — ; 2° le seul argument en faveur d'un pouvoir neutralisant de la pénicilline sur des groupes SH libres dans les microbes est la faculté que possèdent ces groupements d'inactiver l'antibiotique (Cavalito [40]) ; 3° l'activité de certains enzymes dont des — SH sont des groupements actifs (triosephosphatedéshydrogénase, succinodéshydrogénase) n'est pas modifiée par la pénicilline [4].

V. ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR LE CAPTAGE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE PAR LES STAPHYLOCOQUES. — Shwartzman [41] a étudié le premier les rapports entre l'antibiotique et les aminoacides : chez le staphylocoque, certains aminoacides (acides aspartique et glutamique, cystine, arginine, histidine et hydroxyproline) inhibent l'action de la pénicilline tandis que d'autres la renforcent (méthionine, thréonine).

S'agissait-il d'une action de la pénicilline sur l'utilisation des aminoacides ou bien d'une action des aminoacides sur un processus touché par l'antibiotique, sorte d'antagonisme entre la pénétration et l'utilisation des aminoacides et celles de la pénicilline ? D'après l'auteur, il semble que l'activité « antipénicilline » de certains aminoacides est due à l'influence propre de ces substances sur le métabolisme bactérien.

Du Vigneau a noté que de la pénicilline, obtenue par synthèse à partir de la *D*-pénicillamine (*D*-cystéine), était active tandis que de la pénicilline, obtenue par synthèse à partir de la *L*-pénicillamine (*L*-cystéine), n'avait pas de pouvoir antibiotique [42].

Gale a montré, d'autre part, que des doses subléthales de pénicilline suffisaient à enlever au *Staphylococcus aureus* le pouvoir de concentrer en son sein l'acide glutamique présent dans le milieu de culture [24].

La captation de l'acide glutamique par les bactéries ne peut s'effectuer qu'aux dépens d'un autre processus métabolique libérant de l'énergie et tout particulièrement la fermentation du glucose (6). L'une des principales conséquences de cette fermentation du glucose est l'accumulation d'A. T. P. par la bactérie [43, 44]. Ces faits nous avaient conduits à formuler l'hypothèse [2] que la captation de l'acide glutamique par les bactéries Gram-positives était peut-être en relation avec le métabolisme de l'A. T. P. (ou d'un mononucléotide); l'inhibition par la pénicilline du captage de l'acide glutamique pouvant n'être qu'une conséquence de l'action sur le métabolisme nucléaire. Un travail très récent de Gale [7] confirme notre point de vue en montrant qu'il y a un lien étroit entre la captation de l'acide glutamique et le métabolisme de l'acide ribonucléique. D'ailleurs Gale note aussi que l'A. T. P. peut suffire comme source de l'énergie nécessaire à la captation de l'acide glutamique.

Ici encore le stade de l'utilisation des mononucléotides (ou le processus inverse de synthèse de mononucléotides dont les catalyseurs peuvent être les mêmes) doit jouer un rôle prépondérant dans l'action de la pénicilline.

RÉSUMÉ.

Le point central de l'action antibiotique de la pénicilline semble être le métabolisme des monoribonucléotides. Toutes les autres actions observées peuvent être interprétées comme une conséquence de l'action de l'antibiotique sur le métabolisme des monoribonucléotides ou de leurs dérivés (freinage de la lyse bactérienne dans les émulsions non proliférantes, lyse des bactéries en croissance, inhibition de la réaction de Stickland chez *Clostridium sporogenes*, inhibition de la captation de l'acide glutamique par *Staphylococcus*, modification du potentiel d'oxydoréduction).

On ne peut pas encore préciser comment la pénicilline agit sur le métabolisme des mononucléotides. Il est possible qu'une réaction avec des groupements soufrés d'enzymes ou d'effecteurs enzymatiques soit en cause. Mais nous avons pu montrer que la pénicilline n'agit pas sur les phosphomonoestérases des nucléotides. Son action doit porter sur la coupure entre ribose et base ou bien sur le métabolisme du ribose-phosphate.

(6) Le processus libérateur d'énergie peut être également la désamination de l'arginine, mais la captation de l'acide glutamique se fait alors moins bien.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GROS et MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 298.
- [2] GROS et MACHEBOEUF. *Bull. Acad. Méd.*, 1948, **132**, 80.
- [3] GROS et MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1948, **74**, 368.
- [4] KRAMPITZ et WERKMAN. *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 57.
- [5] BOIVIN, TULASNE, VENDRELY et MINCK. *Bull. Acad. Méd.*, 1948, **132**, 31.
- [6] VENDRELY, TULASNE et MINCK. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 239.
- [7] GALE. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1948, **83**, 119.
- [8] DUFRENOY et PRATT. *J. Bact.*, 1947, **54**, 283.
- [9] BELLAMY et KLIMEK. *J. Bact.*, 1948, **55**, 153.
- [10] HENRY et STACEY. *Nature*, 1943, **151**, 671.
- [11] FRIEDEN et FRAZIER. *Arch. Bioch.*, 1947, **15**, 265.
- [12] MASSART, PEETERS et VANHOUE. *Experientia*, 1947, **3**, 494.
- [13] GROS, RYBAK, MACHEBOEUF et RAMBECH. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1550.
- [14] ZITTE. *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 530.
- [15] GROS et MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1736.
- [16] ALBERTS. *Hand. d. Enzymologie*, I, 408.
- [17] SCHMIDT, CUBILES, SCHWARTZ, THANNHAUSER. *J. biol. Chem.*, 1947, **170**, 759.
- [18] BRIGGS. *J. biol. Chem.*, 1922, **53**, 13.
- [19] MESROBEANU. *Thèse Paris*, 1935.
- [20] MAC FAYDEN. *J. biol. Chem.*, 1934, **107**, 297.
- [21] DICKENS. *Bioch. J.*, 1938, **32**, 1626 ; *ibid.*, 1645.
- [22] GROS et MACHEBOEUF. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 360.
- [23] RAYNAUD et GROS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1003.
- [24] GALE. *Nature*, 1946, **158**, 676.
- [25] RICHARDSON. *J. biol. Chem.*, 1936, 2815.
- [26] HIRSCH et DOSGOGRU. *Arch. Bioch.*, 1947, **14**, 207.
- [27] GROS, MACHEBOEUF et LACAILLÉ. *Ces Annales*, 1948, **75**, 320.
- [28] STACEY et WEBB. *Nature*, juillet 1948.
- [29] TODD. *Lancet*, 1945, **248** (1), 74.
- [30] GORINI et TORRIANI. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1948, **2**, 226.
- [31] PRATT et DUFRÉNOY. *J. Bact.*, 1948, **54**, 357.
- [32] PANJEL. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, **30**, 116 et *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **42**, 4681.
- [33] CASPERSSON. *Sympos. Soc. Exptl. Biol. (Nucleic Acids)*, 1947, 127.
- [34] GROS et MACHEBOEUF. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1318.
- [35] MULE. *Ann. Igiene*, 1946, **56**, 298.
- [36] DROUHET. *Ces Annales*, 1949, **76**, 168.
- [37] MALMGREN et HEDEN. *Act. Microbiol. Scand.*, 1948.
- [38] ZITTE. *J. biol. Chem.*, 1946, **162**, 287.
- [39] DUFRENOY et PRATT. *J. Bact.*, 1947, **54**, 283.
- [40] CAVALLITO. *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 29.
- [41] SHWARTZMAN. *J. Exp. Med.*, 1946, **83**, 65.
- [42] DU VIGNEAUD. *Relation between activity from aminoacids and optical forms*.
- [43] O'KANE et UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1942, **42**, 25.
- [44] GROS et MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1948, **74**, 347.

CALCIUM ET PHOSPHATES

DANS LA MULTIPLICATION DE BACTÉRIOPHAGES

par R. WAHL et L. BLUM-EMERIQUE (*).

(Institut Pasteur.)

Dans une publication antérieure (1), l'un de nous a étudié le rôle de certains éléments du milieu de culture dans la multiplication de certains phages.

Il a montré en particulier, pour les phages S 13 et C 36, qu'il existe un optimum de concentration des ions Ca^{++} au-dessus et au-dessous duquel la multiplication des phages est faible ou nulle.

Les expériences sur C 36 étaient faites en ajoutant des quantités variables de chlorure de calcium au milieu synthétique de base suivant :

Sulfate d'ammonium	0,75 g.
Chlorure de potassium	0,50 g.
Sulfate de magnésium	0,05 g.
Phosphate monopotassique	13,6 g.
Acide nicotinique	0,01 g.
Eau bidistillée.	Q. S. 1 litre.

Alcaliniser à pH 7,8 avec de la soude et ajouter, après stérilisation, 0,65 p. 100 d'une solution de glucose à 30 p. 100.

Pour S 13, on avait utilisé un milieu de base à l'autolysat de levure, la multiplication de ce phage s'étant révélée impossible dans le milieu synthétique ci-dessus.

La présente note relate la continuation de ces recherches.

Elle complète, d'une part, les expériences sur le rôle du calcium dans la multiplication de C 36 et elle montre, d'autre part, que, pour S 13, on peut en réalité obtenir une multiplication en milieu synthétique, à condition de modifier la teneur en phosphates de celui-ci. Cette constatation nous a permis, comme nous le verrons, d'étudier un mutant de S 13, sur lequel, d'ailleurs, nous reviendrons dans une prochaine publication.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 avril 1949.

(1) R. WAHL, ces *Annales*, 1946, **72**, 73.

1° ACTION DU CALCIUM SUR C36.

Nous avons constaté qu'une certaine multiplication de ce phage se produisait quand on introduisait dans le milieu synthétique de 4 à 120 mg. par litre de CaCl_2 avec un optimum pour 60 mg. Au-dessous de 4 mg. et au-dessus de 110 mg., le phage ne se multipliait pas. Dès qu'on s'écartait de l'optimum, la multiplication diminuait rapidement.

Mais nous avons pensé qu'une partie du calcium pouvait être précipitée dans ce milieu riche en phosphates, et que de ce fait une erreur d'interprétation était possible.

C'est pourquoi nous avons repris l'expérience en remplaçant les phosphates par du glycérophosphate de sodium (720 mg. par litre de PO_4).

On ajoute à une série de tubes de milieu synthétique sans calcium des quantités croissantes d'une solution de chlorure de calcium à 0,4 p. 100. On ensemence avec la souche *E. coli* 36, on met au bain-marie à 37° avec agitation et y ajoute une heure après du phage C36 (concentration du phage dans le milieu au départ : 4×10^4 par centimètre cube).

Quatre heures et demie plus tard, on titre après centrifugation le phage dans chaque tube (tableau I).

Le glycérophosphate de calcium est soluble dans un tel milieu : tout le calcium est ionisé. La quantité d'ions calcium dans le milieu est donc exactement proportionnelle à la quantité de CaCl_2 introduite.

TABLEAU I.

CaCl_2 par litre	TITRE DU PHAGE par centimètre cube	
6,7	30×10^2	
20,1	30×10^3	
26,8	$< 1 \times 10^2$	
33,5	$< 1 \times 10^2$	
40,2	30×10^2	
46,9	60×10^2	
53,6	20×10^3	
67	30×10^3	
80	180×10^6	} Lyse et optimum.
100	510×10^6	
134	42×10^2	

On voit que ces résultats non seulement confirment les précédents, mais qu'ils les précisent. Dans le milieu aux phosphates, le titre le plus élevé ($2,5 \times 10^8$ par centimètre cube) était obtenu avec 0,006 g. de CaCl_2 par litre, mais une certaine multiplication du phage se produisait encore avec d'autres quantités de CaCl_2 . D'après les expériences actuelles, on voit que la présence de phosphates ne paraît pas rendre les ions Ca^{++} en partie inac-

tifs pour les phages. En effet, la quantité optima de CaCl_2 n'est pas, dans le milieu au glycérophosphate, inférieure à celle du milieu aux phosphates. De plus, à la lumière de nos nouvelles expériences, la règle de la concentration optima de l'ion Ca^{++} paraît encore plus nette. La multiplication par 0,08 et 0,1 de CaCl_2 par litre est très forte. Elle est pratiquement nulle pour les autres quantités de calcium.

2° ACTION DE PO_4 SUR S13.

La multiplication de S13 sur la souche Y6R en milieu synthétique ne se fait que si la concentration en phosphates est inférieure à une certaine valeur (tableau II).

TABLEAU II.

PO_4 en gramme par litre	TITRE FINAL (phages par centimètre cube)
0,059	$4,5 \times 10^8$
0,176	$1,5 \times 10^8$
0,332	2×10^7
0,442	$3,5 \times 10^5$
0,586	$1,15 \times 10^5$

Dans l'expérience du tableau II, on a introduit dans la culture 10^5 phages par centimètre cube, et une quantité de CaCl_2 très faible. On voit que la multiplication du phage est nulle quand la concentration de phosphates dans le milieu atteint 0,586 g. par litre (calculée en PO_4). La multiplication est d'autant plus grande que la concentration en phosphates est plus faible, tant qu'un minimum n'est pas dépassé. Ce minimum correspond à 0,050 g. de PO_4 par litre environ, dans le cas présent.

Mais la multiplication est meilleure et la tolérance des phosphates plus grande si le milieu contient des ions Ca^{++} à la concentration optima (voir tableau IV). S13 se multiplie bien dans un milieu synthétique de pH 7,6 contenant 0,800 g. de PO_4 par litre environ et la quantité appropriée de Ca^{++} (introduit comme CaCl_2). Dans ce milieu on observe la lyse de la bactérie. Par contre, d'autres phages (C16 et C36), dans les mêmes conditions, sont indifférents à la quantité de phosphates du milieu.

Par la suite, nous avons isolé un mutant de S13 dans les circonstances suivantes :

Nous avons isolé à partir des colonies secondaires apparues dans les grandes plages de S13 deux mutants résistants de la bactérie. Ayant remarqué que sur ces colonies apparaissaient secondairement des petites plages, nous avons isolé de nouveau le phage à partir de ces plages secondaires. Ce phage est actif sur l'une des souches mutantes de la bactérie, la souche G. C.,

sur laquelle il produit des petites plages (type β) et sur la souche primitive Y6R, sur laquelle il donne de grandes plages (type α).

La souche G. C. pousse très bien en bouillon, en eau peptonée et en milieu synthétique, quelle que soit la quantité de phosphates. Le phage se multipliait bien sur la souche G. C. en eau peptonée, mais pas du tout en bouillon, ni dans le milieu synthétique favorable à S 13.

Nous avons pu obtenir sa multiplication sur G. C., en diminuant la concentration des phosphates dans le milieu synthétique. Nous avons en même temps constaté que les besoins en calcium sont les mêmes sur G. C. et sur Y6R. Pour nous assurer que l'inhibition des phages par un excès de phosphate n'était pas due à une précipitation de calcium, nous avons étudié comparative-ment l'effet des phosphates et du glycérophosphate de sodium ajoutés à de l'eau peptonée (tableau III). Les phosphates sont ajoutés sous forme d'un mélange de PO_4KH_2 et $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ à pH 7,8.

L'addition de glycérophosphate ne modifie pas le pH sensiblement.

On avait vérifié au préalable que des quantités de glycéról comprises entre 0.033 g. et 0.300 g. par litre n'exercent pas d'action sur la multiplication du phage sur G. C.

Nous avons dosé préalablement la quantité de phosphates de l'eau peptonée. Elle équivaut à 530 mg. de PO_4 par litre.

TABLEAU III.

PHOSPHATES AJOUTÉS (g. de PO_4 par litre)	GLYCÉROPHOSPHATE AJOUTÉ (g. de PO_4 par litre)	TITRE FINAL (phages par cm^2)
0	0	2×10^9
0,177		$1,6 \times 10^9$
	0,240	$2,2 \times 10^9$
0,354	5	9×10^8
0,530		$1,0 \times 10^8$
0,708		3×10^6
	0,720	9×10^6
0,885		2×10^7
1,060		8×10^5
	1,200	8×10^5
	1,680	7×10^4
	2,160	$1,2 \times 10^4$

On voit que l'addition de PO_4 sous forme de phosphate ou de glycérophosphate a exactement le même effet. Une addition de l'un ou de l'autre ne diminue pas la multiplication du phage sur la souche G. C. tant qu'elle ne dépasse pas 0,530 g. par litre (calculés en PO_4).

Pour 0,700 g. et plus de PO_4 par litre; la multiplication sur G. C. est très nettement diminuée et d'autant plus que la quantité ajoutée est plus grande.

Il restait à comparer l'action de PO_4 sur la multiplication du phage sur G. C. à celle exercée sur sa multiplication sur Y6R.

Les expériences précédentes montrent qu'en introduisant dans le milieu indifféremment des phosphates ou des glycérophosphates, on obtenait le même effet pour la multiplication sur G. C. pour une même dose de PO_4 .

Les expériences suivantes ont donc été faites en milieu synthétique additionné de CaCl_2 et de quantités croissantes de glycérophosphates, en prenant soin de ne pas modifier le pH.

On évite ainsi toute possibilité d'erreur, au sujet de l'ion Ca^{++} . Ces expériences avaient pour but de comparer l'action de PO_4 sur la multiplication du phage avec Y6R à l'action sur sa multiplication avec la souche mutante G. C.

Le tableau suivant apporte d'abord la confirmation de notre première constatation : l'inhibition de S13 par des doses de PO_4 supérieures à 5 g. par litre. Sous forme de glycérophosphate, les mêmes doses de PO_4 avaient les mêmes résultats que sous forme de phosphates.

On voit, en outre, que les doses inhibitrices de PO_4 ne sont pas les mêmes pour le phage sur Y6R que sur G. C.

TABLEAU IV.

PO_4 (grammes par litre)	SUR Y6R (titre final)	SUR G. C. (titre final)
0,240	$2,4 \times 10^8$	9×10^7
0,480		3×10^7
0,720	$2,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^7$
0,950		$1,8 \times 10^6$
1,200		0
1,440		0
1,680	5×10^8	
2,160	2×10^8	
2,880	4×10^8	
3,600	6×10^7	
5,800	2×10^6	
7,200	3×10^5	

Pour faire une comparaison exacte, il faut tenir compte que, de façon générale, la multiplication sur G. C. est moindre, parce que la souche G. C. pousse beaucoup plus lentement dans ce milieu que Y6R. Compte tenu de cette différence, on voit que la multiplication sur G. C. est bonne pour des doses de PO_4 comprises entre 240 et 700 mg. par litre (les différences constatées

dans cette série de concentrations ne sont pas significatives), qu'elle baisse nettement vers 900 mg. par litre et qu'elle est nulle à 1.200 mg. L'absence de multiplication sur G.C. en bouillon pourrait donc s'expliquer par un excès de phosphates.

La multiplication sur Y6R se fait encore très bien jusqu'à 3 g. de PO_4 par litre environ, bien que le titre obtenu entre 0,240 g. et 1 g. de PO_4 par litre paraisse légèrement supérieur à celui obtenu entre 1 g. et 3 g. de PO_4 par litre. Il faut ajouter (nous y reviendrons dans une prochaine note) qu'un phage S13 qui s'était toujours multiplié sur Y6R donne dès son premier passage sur G.C. des petites plages et redonne aussitôt après de grandes plages sur Y6R et que, quelle que soit l'histoire antérieure du phage, la taille des plages, comme les besoins en phosphates sont fonction de la souche sur laquelle il se multiplie.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° La règle que nous avons déjà énoncée d'une zone de concentration optima en ions Ca^{++} pour la multiplication de certains phages est confirmée par des expériences où les glycérophosphates remplacent les phosphates.

2° Certains phages (S13) sont inhibés par une concentration en phosphates dépassant une certaine limite, alors que d'autres (C16, C36) paraissent indifférents aux phosphates.

3° Cette concentration limite est beaucoup plus basse quand S13 se multiplie sur une souche mutée, issue de la souche sensible Y6R, que sur cette souche sensible elle-même. Dès que le phage est remis sur la souche initiale, il reprend tous les caractères primitifs : aspect des plages et sensibilité aux phosphates.

4° L'explication de ces actions doit probablement être recherchée dans l'influence qu'elles exercent sur certains processus enzymatiques. En effet, une action tantôt stimulante, tantôt inhibitrice, suivant les doses, a été observée également pour l'ion Ca^{++} sur le complément (Heidelberger), et pour PO_4 sur les phosphatases.

5° Au point de vue pratique, il faut retenir que pour obtenir de bons rendements en phages, la plus grande attention doit être donnée à la teneur des milieux en Ca^{++} et en PO_4 . En particulier, il faut noter l'inconvénient des milieux courants (bouillon, eau peptonée) dont la teneur en calcium et en phosphates est très variable.

Pour les milieux synthétiques ou demi-synthétiques, une étude particulière de l'influence de ces éléments doit être faite dans chaque cas.

ACTION DE LA STREPTOMYCINE
SUR
***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* PAR CONTACT DIRECT**
OU A TRAVERS DES BOUGIES FILTRANTES

par P. J. COLETSOS (*).

(Travail des Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose,
Institut Pasteur. Chef de Service : D^r BRETEY.)

En clinique, l'inefficacité de la streptomycine, administrée par voie générale, sur la caverne tuberculeuse, la tuberculose ganglionnaire et les formes de tuberculose enkystée en général, pourrait être expliquée, outre les nombreux facteurs biologiques, par des facteurs purement physiques. Dans le but d'apporter la confirmation expérimentale *in vitro* à cette hypothèse, nous avons entrepris l'expérience suivante :

Deux souches de *Mycobacterium tuberculosis*, la souche H 37 Rv et une souche récemment isolée d'un malade tuberculeux pulmonaire cavitairé traité depuis un mois par la streptomycine, (35 g. au total) ont été étudiées.

La sensibilité de ces deux souches à la streptomycine éprouvée par titrage en milieu de Dubos homogène au Tween 80 avec 5/100 de mg. de bacilles pour 5 cm³ de milieu était à 0,2 unité de streptomycine pour la première et à 0,5 unité pour la seconde.

CONDITIONS D'EXPÉRIENCES. — Les deux souches ont été étudiées parallèlement et dans des conditions d'expérience identiques, qui étaient les suivantes :

Culture de 1/10 de mg. de bacilles dans 30 cm³ de milieu de Youmans streptomyciné à des taux progressivement croissants, 1, 2, 5, 10 et 20 unités par centimètre cube.

L'ensemencement a été effectué dans 4 séries de tubes, chaque série comportant un tube témoin.

Première série. — Culture de 1/10 de mg. de bacilles dans 30 cm³ de milieu de Youmans. Les tubes contenaient respectivement 30, 60, 150, 300 et 600 unités de streptomycine pour avoir

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mai 1949.

une concentration de streptomycine de 1, 2, 5, 10 et 20 unités par centimètre cube. De plus, un tube témoin est ensemencé sans streptomycine.

Deuxième série. — Identique à la première, mais alors que dans celle-ci, la streptomycine était en contact direct avec les bacilles, dans la deuxième série, comme dans les séries suivantes, la streptomycine n'exerça son action antibiotique qu'à travers une bougie filtrante Chamberland L₃, contenant 5 cm³ de milieu de Youmans, de telle sorte que les bacilles étaient à l'extérieur de la bougie dans 25 cm³ de milieu de Youmans et la streptomycine à l'intérieur de la bougie, dans 5 cm³ de ce même milieu.

Troisième série. — Identique à la deuxième, avec la différence que la streptomycine introduite à l'intérieur de la bougie filtrante était diluée dans 5 cm³ de sérum de cheval et non dans du milieu de Youmans.

Quatrième série. — Identique à la deuxième série, c'est-à-dire que la streptomycine était à l'intérieur de la bougie filtrante dans 5 cm³ de milieu de Youmans, mais les bougies filtrantes avaient été renforcées auparavant par une mince membrane de collodion. La porosité de cette série de bougies filtrantes n'a pas été déterminée de façon précise.

RÉSULTATS (1). — Les résultats sont représentés sur les figures 1, 2, 3 et 4, d'où ressortent nettement :

1° La différence de culture du *Mycobacterium tuberculosis* en présence de doses croissantes de streptomycine.

2° La différence de développement, suivant que l'action de l'antibiotique est exercée sur le bacille par contact direct ou par dialyse.

3° Le déplacement du seuil de bactériostase, pour les deux souches considérées, qui se trouve porté vers des concentrations de streptomycine d'autant plus élevées que le barrage séparant les bacilles de l'antibiotique est plus difficilement perméable à celui-ci.

4° Le rôle empêchant du sérum sanguin dans la diffusion de l'antibiotique à travers un filtre reconnu par ailleurs comme parfaitement perméable aux solutions isotoniques.

5° Le rôle stimulant de très faibles doses de streptomycine pour le développement des bacilles entraînés à la streptomycine *in vivo*.

En considérant le comportement des deux souches étudiées

(1) La lecture a été faite le seizième et le vingt et unième jour de la culture. Le développement macroscopique a été confirmé par repiquage sur milieu de Youmans et sur milieu de Löwenstein-Jensen non streptomycinés.

dans des conditions d'expérience identiques, on relève en outre :

1° L'absence de parallélisme net entre la souche H 37 Rv, qui n'a jamais, auparavant, été en contact avec l'antibiotique, et la

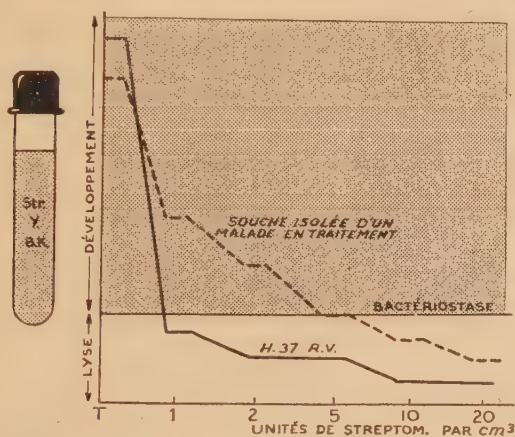


FIG. 1. — Culture en milieu de Youmans streptomyciné en tubes ordinaires. Différence de culture et de développement des deux souches bacillaires.

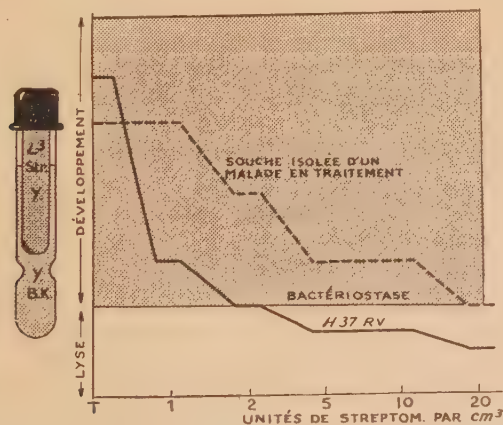


FIG. 2. — Culture en milieu de Youmans streptomyciné à travers un filtre L_8 simple.

souche isolée d'un malade qui avait subi un traitement par la streptomycine, pendant un mois (35 g. au total).

En effet, pour la deuxième souche issue d'un malade en traitement (compte tenu de la différence de sensibilité au départ avec la souche H 37 Rv, dans les conditions d'expérience indiquées), le déplacement du seuil de la bactériostase, vers des concentrations

plus élevées de streptomycine, a été plus considérable pour cette souche que pour la H 37 Rv.

2° Il aurait été intéressant de pouvoir titrer la streptomycine

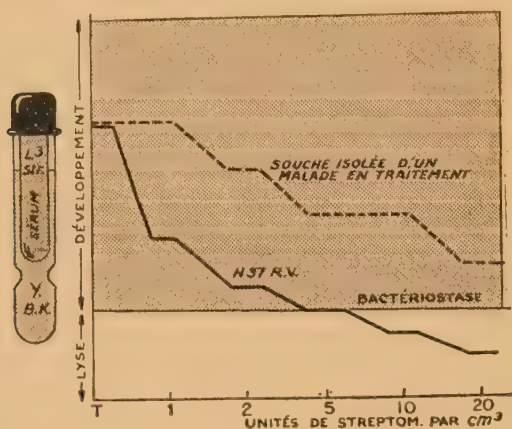


FIG. 3. — Culture en milieu de Youmans streptomyciné à travers un filtre L₃ contenant du sérum.

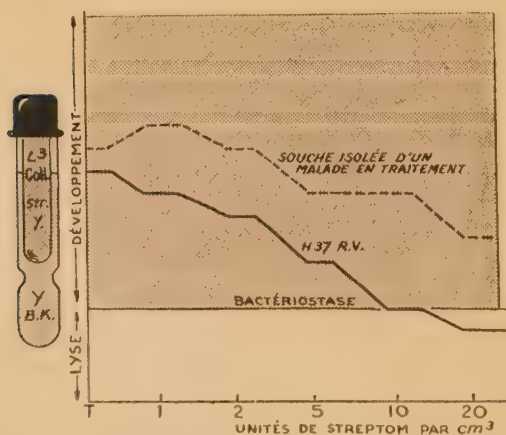


FIG. 4. — Culture en milieu de Youmans streptomyciné à travers un filtre L₃ enduit d'une mince membrane de collodion.

au cours et à la fin de l'expérience à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des bougies filtrantes, afin de déterminer le pourcentage et la rapidité de diffusion de l'antibiotique d'une part et la quantité de streptomycine immobilisée par la bougie filtrante et par le sérum (série III) d'autre part.

N'ayant procédé qu'au titrage de la streptomycine à l'intérieur des bougies filtrantes et seulement à la fin de l'expérience, nous ne nous estimons pas autorisé à tirer une conclusion valable sur cet aspect du problème, qui fait l'objet de recherches complémentaires.

En attendant la confirmation de ces premières constatations par l'étude d'un nombre plus considérable de souches d'origine et de sensibilité variables, nous nous estimons en droit de conclure :

1° Au rôle empêchant des facteurs purement physiques dans l'action des antibiotiques lorsqu'un barrage plus ou moins perméable existe entre l'antibiotique et le germe à atteindre.

2° A la possibilité de neutraliser ces facteurs en partie par l'augmentation des concentrations de l'antibiotique. Cette éventualité facile *in vitro* n'est pas toujours réalisable *in vivo*.

3° Enfin, l'importance de ces facteurs dont le rôle empêchant a été démontré *in vitro* paraît être dépendante et directement liée à la nature, la constitution et l'ancienneté des lésions *in vivo*. Considérés individuellement ou dans leur ensemble, ils mériteraient d'être désignés par le terme de « facteurs de résistance lésionnelle ».

REMARQUES SUR LE MODE D'ACTION DE LA STREPTOMYCINE

par B. RYBAK, F. GROS et M^{me} F. GRUMBACH (*).

(Institut Pasteur.)

Fried et Wintersteiner [1] ont indiqué que si le carbonyle du groupement streptose de la streptomycine était oxydé en carboxyle, on obtenait un produit — l'acide streptomycinique — dépourvu de toute activité antibiotique. Or, la streptomycine forme des sels insolubles avec certaines substances à point isoélectrique acide dont les acides nucléiques [2, 3, 4] et la céphaline [5]. Nous avons alors recherché si l'inactivité de l'acide streptomycinique était en relation avec la non-formation de ces composés insolubles.

Partant de chlorhydrate de streptomycine, nous avons préparé l'acide streptomycinique en nous conformant aux indications données par Fried et Wintersteiner [1] (1). Or, contrairement aux résultats des auteurs américains, notre préparation s'est montrée douce d'une certaine activité antibiotique (250 unités par milligramme par titrage Heatley sur *Klebsiella pneumoniae* ; la streptomycine-mère titrait 650 unités par milligramme dans les mêmes conditions). Troublés par ces résultats, nous avons alors oxydé une nouvelle streptomycine (chlorhydrate) et nous avons obtenu un acide streptomycinique dont l'activité antibiotique était pratiquement la même que celle de notre dernière préparation. Nous avons écrit au Dr J. Fried, qui a eu la grande obligeance (2) de nous faire parvenir une certaine quantité de streptomycine trihydrochlorure (absolument dépourvue de streptomycine B), ainsi que de l'acide streptomycinique qui avait été préparé à partir d'une streptomycine ancienne (renfermant de la strepto-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 avril 1949.

(1) L'opération essentielle — l'oxydation — s'effectue par l'eau de brome pendant cinq jours à la température du laboratoire et à l'obscurité.

(2) Nous tenons à le remercier bien vivement.

mycine et de la streptomycine B). Cet acide streptomycinique nous a donné les valeurs antibiotiques relevées dans le tableau I.

TABLEAU I. — **Activité de l'acide streptomycinique**
Fried-Wintersteiner (technique Heatley).

GERMES UTILISÉS	RÉSULTATS	pH
Spores de <i>B. subtilis</i> Waksman	400 U./mg.	7,0 neutralisation par NaOH N/50.
<i>S. aureus</i> (souche London).	100 U./mg.	
<i>Kleb. pneumoniae</i> D.	150 U./mg.	
<i>S. aureus</i> L. (souche accoutumée à 100.000 U. de streptomycine	0	

Nous avons alors préparé deux nouvelles fois de l'acide streptomycinique à partir des 400 mg. de la streptomycine trihydrochlorure de Fried. Nos résultats ont toujours été constants (technique Heatley) : la streptomycine trihydrochlorure titrait de 800 à 850 unités par milligramme [son titre serait de 880 unités par milligramme, suivant J. Fried (3)] ; les acides streptomyciniques correspondants titraient encore 200 unités par milligramme en moyenne (10 titrages) ; ces valeurs ont été obtenues sur spores de *B. subtilis* Waksman et sur *Klebsiella pneumoniae*.

Il y a donc là un désaccord expérimental provenant sans doute des techniques différentes utilisées pour le titrage (technique en bouillon par Fried et Wintersteiner (3), technique Heatley dans nos expériences) ; les bouillons de culture renferment en effet des sels qui peuvent plus ou moins inhiber l'action de la streptomycine [6, 7, 8].

Quoi qu'il en soit, du point de vue chimique, nous avons découvert que le comportement de l'acide streptomycinique vis-à-vis de l'acide ribonucléique d'une part, et de la céphaline d'autre part, était différent de celui de la streptomycine. En effet, l'acide streptomycinique ne précipite plus avec l'acide ribonucléique de levure à pH 7,0 alors qu'il précipite avec la céphaline au même pH. Pour que la précipitation ait lieu avec l'acide ribonucléique, il faut partir d'une solution de cet acide à son pH propre qui est fonction de sa concentration (le complexe ainsi formé se dissout à pH 7) ou acidifier une solution neutre d'acide ribonucléique. Le tableau II donne le résultat de lectures opacimétriques effectuées en lumière rouge au photomètre de Meunier (volume final auquel sont ramenées toutes les dilutions : 10 ml.).

TABLEAU II.

INTEN-ITÉ DES COMPLEXES FORMÉS AVEC L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE (1)			
ET LA STREPTOMYCINE-HCl		ET L'ACIDE STREPTOMYCINIQUE (2)	
Quantité de streptomycine en γ	Valeur photométrique	Volume en millilitre de l'acide streptomycinique	Valeur photométrique
800	16	0,1	16
1 600	65	0,2	25
2 400	136	0,3	42
3 200	140	0,4	82
4 000	160	0,5	117
5 600	162		
pH 7,0		pH 4,0	

(1) Solution d'acide nucléique de levure à 5 mg. par millilitre en eau b'distillée.

(2) Acide streptomycinique à 5 mg. par millilitre + 0,5 ml. d'acide ribonucléique (1) à pH 7,0 + 0,4 ml. d'acide sulfurique N/100.

STREPTOMYCINE-CYSTÉINE.

Poursuivant notre étude sur la réactivité des dérivés dénaturés de la streptomycine, nous avons inactivé 5.000 U. de streptomycine dissoutes dans 5 ml. d'eau bidistillée par 0,5 ml. de cystéine-HCl M/10 (tampon phosphate pH 7,8) pendant douze heures à 37° C. Après précipitation acétonique et lavage à l'éther, le produit était dissous dans 5 ml. d'eau bidistillée. Cette solution ne titrait plus que 5 U. environ sur *Bacillus subtilis* (technique Heatley) et ne formait plus de complexe insoluble ni avec l'acide ribonucléique de levure ni avec la céphaline (4).

NOUVEAUX COMPLEXES ENTRE SUBSTANCES A POINT ISO-ÉLECTRIQUE OPPOSÉ.

La réactivité sélective de l'acide streptomycinique vis-à-vis des céphalines à des pH physiologiques nous a conduits à considérer le rôle de substances à point iso-électrique acide (ou plus généralement à point iso-électrique relativement plus acide) pouvant :

Soit se situer à la périphérie des cellules bactériennes et ainsi rendre compte des agglutinations plus ou moins typiques que nous avons obtenues avec la streptomycine [10] ;

Soit se situer d'une façon quelconque dans la topographie bac-

(4) Von EULER et HELLER [9] ont déjà signalé que la streptomycine inactivée par la cystéine ne précipitait pas avec les acides nucléiques.

térienne, mais représenter des métabolites sensibles à la streptomycine.

Nous avons mis en évidence les faits suivants :

1° L'acide adénosinetriphosphorique, l'acide adénylique, l'acide cytidylique, le coenzyme I respectivement, à pH 7,0, n'ont formé aucun précipité avec la streptomycine ; par contre, la thymohistone de veau précipite avec ces substances, de même la tryptaflavine donne des résultats positifs.

2° Alors que la streptomycine ne précipite ni avec l'antigène O de *Phytomonas (Bacterium) tumefaciens* S (souche « 42/4 »), ni avec celui d'*Eberthella typhosa* O 901 [5], ce qui rend sans doute compte de la non-agglutinabilité de ces germes par cet antibiotique [10], la thymohistone donne des flocons volumineux avec ces mêmes antigènes, flocons insolubles dans la solution d'Edsall mais solubles dans la solution d'Edsall-urée, insolubles par chauffage. On a déjà indiqué [11] que la thymohistone agglutinait tant les germes Gram-positifs que les germes Gram-négatifs, mais ces résultats nous paraissent, de plus, interpréter ceux de Miller et ses collaborateurs [12] et ceux de Pittmann [13], relatifs à la sensibilisation des germes Gram-négatifs vis-à-vis de certains antiseptiques (la tyrothricine par exemple) par les protéines basiques, le bleu de méthylène ou encore les acridines ; nous avons pu constater que ces colorants forment des composés insolubles avec l'antigène somatique et l'haptène polysaccharidique d'*E. typhosa* O 901 ;

3° Nous avons déjà signalé [5] que les lipides extractibles de *Mycobacterium tuberculosis* par le méthylal ne formaient pas de complexes insolubles avec la streptomycine ; par contre, nous avons pu mettre en évidence la précipitation de l'acide mycolique avec la streptomycine-HCl à pH 7 (5) ; la tryptaflavine donne également une réaction positive ; de plus, la tryptaflavine aussi bien que la streptomycine donnent un précipité avec la fraction lipidique (céphalines) de l'antigène O d'*E. typhosa* O 901.

4° Le sulfate d'arcaïne (dérivé diguanidylé) donne une faible opalescence avec la céphaline ; cette opalescence disparaît par adjonction de citrate de sodium mais non par adjonction de chlorure de calcium. Avec l'acide ribonucléique à pH 7, le sulfate d'arcaïne ne donne aucune opacification ; or pour des concentrations allant de 1 à 10 mg. par millilitre, le sulfate d'arcaïne n'exerce aucun effet antibactérien (titrage sur *B. subtilis* par la technique Heatley).

(5) La solution opalescente d'acide mycolique est préparée en dissolvant cet acide dans l'acétone à chaud, puis en ajoutant un volume d'eau distillée et en chassant ensuite l'acétone par distillation dans le vide ; la solution ainsi obtenue est très stable.

RÔLE DU CHLORURE DE CALCIUM.

Lors de l'étude de l'action des sels sur les complexes acide ribonucléique-streptomycine [4], nous n'avions utilisé que des dérivés sodiques. Le complexe céphaline-streptomycine étant insoluble dans le chlorure de calcium [5] et ce sel précipitant la céphaline et l'acide ribonucléique, nous avons étudié son action.

I. ACTION DU CHLORURE DE CALCIUM SUR LA DISSOLUTION DU COMPLEXE ACIDE RIBONUCLÉIQUE-STREPTOMYCINE. — Nous avons adopté le protocole suivant : à 3 ml. d'une solution neutralisée d'acide ribonucléique de levure à 0,1 %, on ajoute 1 ml. d'une solution de streptomycine contenant 5.000 unités d'antibiotique ; après quinze minutes, on ajoute 1 ml. de la solution de chlorure de calcium ($\text{Cl}_2\text{Ca } 6 \text{ H}_{20}$) à différentes concentrations. Après trente minutes on effectue les mesures opacimétriques en lumière verte de l'appareil de Meunier après avoir ramené tous les volumes à 25 ml. par adjonction d'eau distillée. Dans le témoin 1 ml. d'eau distillée remplace le millilitre de la solution de streptomycine. Le tableau ci-dessous indique les résultats :

	CONCENTRATION EN CHLORURE DE CALCIUM									
	0 témoin	N/500	N/200	N/100	N/50	N/20	N/10	N/5	N/2	N
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nombre de divisions photométriques.	96	94	82	79	71	61	46	40	34	33

On voit qu'à partir de N/200 le chlorure de calcium commence à dissoudre le sel streptomycine-acide ribonucléique. Le chlorure de calcium formant un ribonucléate de calcium insoluble nous avons effectué, parallèlement à l'étude précédente, une étude de l'intensité de ce sel pour des concentrations fixes en acide ribonucléique de levure à pH 7 (3 ml. à 0,1 p. 100) et 1 ml. de chlorure de calcium à différentes concentrations. On complète partout à 5 ml. par de l'eau distillée et on effectue comme précédemment les lectures en lumière verte de l'appareil de Meunier, mais en conservant le volume final de 5 ml. étant donné la faible intensité des opalescences obtenues. Nous avons eu les résultats suivants :

Le chlorure de calcium nous paraît donc agir sur la dissolution des complexes streptomycine-acide ribonucléique par l'ion Cl^- , comme les expériences rapportées en II semblent le prouver.

Remarque. — Avec la céphaline, la streptomycine forme un

	CONCENTRATION EN CHLORURE DE CALCIUM					
	N	N/2	N/5	N/10	N/20	N/50
Nombre de divisions du photomètre.	50	36	15	0	0	0

sel insoluble dans le chlorure de calcium [5]. Le sel céphaline-streptomycine se présentant sous la forme de gros flocons, il est difficile d'effectuer une étude quantitative satisfaisante au photomètre.

II. ACTION DU CHLORURE DE CALCIUM SUR L'ACTIVITÉ ANTIBIO-TIQUE DE LA STREPTOMYCINE. — *Protocole.* — On ajoute 0,5 ml. de la solution de chlorure de calcium de concentration connue à 5 ml. de bouillon à base de peptone glucosée. On utilise comme germe-test *Staphylococcus aureus* souche Londres (10^{-4}), provenant d'une culture de vingt-quatre heures en peptone glucosée. Le tableau III résume nos résultats.

Le chlorure de calcium formant un céphalinate et un ribonucléate de calcium insolubles, on pourrait penser qu'il y a une compétition entre ce sel et la streptomycine, vis-à-vis des mêmes substrats ; c'est pourquoi dans une nouvelle série d'expériences nous avonsensemencé *Staphylococcus aureus* L. en bouillon peptoné-glucosé de telle façon que :

a) Le chlorure de calcium à différentes concentrations soit mis en contact préalable avec les bactéries avant de faire agir la streptomycine (temps de contact : une heure à la température du laboratoire ou six heures à 4° C) ;

b) La streptomycine soit mise en contact préalable avec les bactéries avant de faire agir le chlorure de calcium (même temps de contact qu'en a) ; nous avons utilisé le chlorure de calcium à 6 H₂O N/2 (0,5 ml. dans 5 ml. de bouillon).

Dans les conditions a) et b), l'action inhibitrice du chlorure de calcium était tout à fait comparable à celle obtenue lorsque la streptomycine et le chlorure de calcium étaient ajoutés conjointement au bouillon de culture.

Le chlorure de calcium inhibe donc la streptomycine en agissant non pas comme un compétiteur pour un même substrat, mais comme les autres sels déjà étudiés [4, 8] en empêchant la formation des complexes entre streptomycine et substances sensibles bactériennes. Il reste évidemment toujours possible que le temps de contact préalable du chlorure de calcium soit insuffisant surtout aux températures auxquelles nous avons opéré, les bactéries ne

UNITÉS de streptomycine dans 5 ml. de peptone glucosée	N			N/2			N/5			N/10	
	24 h.	48 h.	3 j.	24 h.	48 h.	3 j.	24 h.	48 h.	3 j.	24 h.	48 h.
300 . . .	—	±	+++	—	+++	+++	—	—	++	—	—
200 . . .	±	+++	+++	—	+++	+++	—	—	+++	—	—
150 . . .	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—
100 . . .	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	—
80 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++
60 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++
50 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	+++	+++	—	+++
40 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	—	+++
30 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20 . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

pouvant peut-être fixer énergiquement le calcium que lorsque leur multiplication est active.

Remarquons que Linz [44] n'a pu observer d'action antagoniste du chlorure de calcium sur l'activité antibiotique de la streptomycine : nos résultats ne sont cependant pas en contradiction, les concentrations utilisées par Linz étant beaucoup trop faibles.

DISCUSSION.

L'étude portant sur la streptomycine inactivée par la cystéine indique qu'il y a une relation certaine entre l'activité antibiotique de la streptomycine et son pouvoir de salification avec certaines substances. De plus, l'acide streptomycinique, pour lequel nous avons constaté une activité antibactérienne non négligeable, forme encore des complexes insolubles avec la céphaline à pH 7, alors qu'il n'en forme plus avec l'acide ribonucléique au même pH ; or, si l'on admet une localisation particulièrement périphérique des phospholipides chez les bactéries [45] et étant donné la participation assignée généralement à ces substances dans les mécanismes de la perméabilité cellulaire, il serait tentant de considérer la streptomycine comme étant en premier lieu un poison de la perméabilité ; dans cet ordre d'idées, on serait amené à envisager l'action bactériostatique (réversible) de la streptomycine comme le résultat d'une combinaison avec les seules substances membranaires « acides », et son action bactéricide (irréversible) découlerait soit d'une prolongation extrême du blocage des échanges métaboliques entre milieu ambiant et milieu intérieur bactérien, soit d'une atteinte ultérieure de certains centres fondamentaux

H²O).

N/50		N/100			N/200			TÉMOIN (0,5 ml. eau bidistillée)		
48 h.	3 j.	24 h.	48 h.	3 j.	4 h.	48 h.	3 j.	24 h.	48 h.	3 j.
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	+	—	—	++	—	—	—	—	—	—
+++	+++	—	+++	+++	—	—	+++	—	—	+++
+++	+++	—	+++	+++	—	++	+	—	+++	+++
+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++	—	+++	+++
+++	+++	++	+++	+++	—	+++	+++	++	+++	+++

(à acides nucléiques). Le cas de l'arcaïne que nous avons signalé pourrait paraître contraire à cette conception puisqu'elle ne précipite pas avec l'acide ribonucléique à pH 7 tandis qu'elle donne une réaction faible, mais nette avec la céphaline au même pH; cependant l'arcaïne est sans doute métabolisable tandis que la streptomycine ne l'est pas, vraisemblablement par suite de ses dimensions (6). D'ailleurs l'importance du complexe céphaline-streptomycine est incomparablement plus grande que celle du complexe céphaline-arcaïne. Toutefois la précipitation entre deux substances est un cas extrême de leur affinité, c'est pourquoi d'ailleurs on ne peut rejeter une intervention stérique possible de l'acide streptomycinique sur les acides nucléiques. Cependant, il ne nous paraît pas sans intérêt d'insister sur l'hypothèse d'une action de la streptomycine sur la perméabilité.

Notons tout d'abord que cette hypothèse ne considère que l'action de la streptomycine sur la cellule entière, cette action n'étant liée qu'à une certaine propriété de l'antibiotique [la basicité due aux groupements guanidiques de la fraction streptidine (6)]. Il est bien évident qu'elle ne peut être mise en opposition avec les différentes actions de la streptomycine sur les molécules ou les complexes moléculaires isolés et qu'en considérant ce fait il est possible que les groupements guanidiques ne supportent

(6) D'après Peck et ses collaborateurs [46], la streptidine ne posséderait aucune activité antibactérienne, mais elle serait encore toxique. Ce fait confirme notre point de vue quant à la toxicité des groupements guanidiques de la streptomycine [5]. L'inactivité antibactérienne de la streptidine nous paraît comparable à celle de l'arcaïne.

pas toutes les propriétés de la streptomycine, mais ils nous paraissent toutefois constituer les groupements antibiotiques par la basicité qu'ils confèrent à la molécule de streptomycine et par les propriétés qui découlent de cette basicité. La notion de *groupements antibiotiques* nous paraît ainsi se définir d'une façon assez peu spécifique.

Pour appuyer notre argumentation, soulignons que la streptomycine est particulièrement active en milieu basique — pH aux environs de 8 — et d'après Linz [44] elle se fixe également mieux sur les bactéries dans cette zone de pH ; or nous remarquerons que c'est là une propriété générale des substances basiques, dont les colorants utilisés en cytologie ou comme antimicrobiens.

De plus, on a montré précédemment [4] que l'intensité du sel acide ribonucléique-streptomycine était maximum à pH 7,0 ; or si l'intensité du sel céphaline-streptomycine se forme encore à $\text{pH} < 6,0$ (zone d'inactivité de la streptomycine), il est, semble-t-il, maximum aux environs de pH 8. D'après Waksman et Schatz [47], l'inactivité de la streptomycine au-dessous de pH 6,0 serait liée au fait que la streptomycine base serait plus active que ses sels : or remarquons que la leucose du vert malachite n'est pas antibactérienne [48]. Pour Abraham et Duthie [49], les ions H^+ empêcheraient la streptomycine de se fixer sur les bactéries ; or, d'après Linz [44], la streptomycine se fixe sur *M. lysodeikticus* à pH 4,1. Nous pensons que l'on peut rapprocher les faits relatifs au rôle du pH sur l'activité de la streptomycine de ceux rapportés par Troendle [20] qui a montré que le chlorhydrate de quinine pénètre plus mal que la quinine, dans les cellules de *Spirogyra* et que cette vitesse de pénétration était encore diminuée quand on acidifiait le milieu ; de même Labes [21] a montré sur des bactéries et des paramécies que des alcaloïdes — comme l'atropine — étaient plus toxiques en milieu alcalin contrairement au salicylate de sodium qui est plus actif en milieu acide. Du point de vue physico-chimique, on doit donc considérer un phénomène de fixation et un phénomène de pénétration, ce qui correspondrait au stade bactériostatique d'une part et au stade bactéricide d'autre part. Nous arrivons ainsi à rapprocher l'action *bactériostatique* de la streptomycine d'une *narcose*.

En ce qui concerne la non-formation de complexes insolubles entre la streptomycine et les dérivés phosphorylés de poids moléculaire relativement bas, nous insisterons encore sur ce que la formation de composés insolubles est un cas particulier de l'affinité ; remarquons que Massart et ses collaborateurs [22] ont montré que la respiration de la levure de boulangerie en milieu glucosé phosphaté était inhibée par différents colorants basiques ; cette inhibition est levée partiellement par addition d'acide nucléique, d'acide adénylique ou d'A. T. P. Les résultats que

nous donnons dans notre présent travail rendent compte de ces faits. (Jeener et Brachet [23] ont signalé incidemment et sans préciser que les mononucléotides devaient se combiner avec le bleu de toluidine.)

Quant à la combinaison streptomycine-acide mycolique, nous soulignerons que la streptomycine fait perdre son acido-résistance au bacille tuberculeux [24] et, en admettant même que l'acido-résistance soit « conditionnée par l'intégrité morphologique de quelque structure cellulaire qui peut être détruite par les moyens mécaniques, enzymatiques ou chimiques dans les conditions qui ne détruisent pas l'acide mycolique » [25], il est incontestable que l'acide mycolique est acido-résistant [26] et nous pensons que la streptomycine peut agir au niveau de ce composé engagé ou non dans quelque complexe. On sait d'ailleurs que de tels complexes existent : N. Choucroun [27, 28, 29] a isolé du bacille tuberculeux une substance toxique constituée par un polysaccharide et l'acide mycolique. Le polysaccharide et l'acide mycolique, pris individuellement, sont dépourvus de toxicité ; les souches de bacilles tuberculeux les plus « virulentes » renferment le plus de ce complexe. On connaît la singulière sensibilité du bacille tuberculeux à la streptomycine et s'il est bien exact qu'*in vivo* cet antibiotique agit particulièrement sur l'acide mycolique ou sur le complexe dans lequel cet acide est engagé, on pourrait considérer que la streptomycine aurait non seulement un pouvoir antibacille tuberculeux, mais également, dans ce cas précis, un pouvoir antidotique. Ce pouvoir est évidemment différent du pouvoir antidotique décelé dans les filtrats d'*Actinomyces griseus* par Ramon et Richou [30] qui, d'après les auteurs, est lié à une activité enzymatique.

RÉSUMÉ.

1° L'acide streptomycinique, préparé à partir de plusieurs échantillons de streptomycine ou provenant du Dr Fried, s'est montré doué d'une certaine activité antibiotique (150 unités par milligramme en moyenne sur *K. pneumoniae*, technique Heatley), ce qui est contraire aux résultats de Fried et Wintersteiner (technique par dilutions en bouillon). Cette divergence paraît s'expliquer par les techniques différentes utilisées (présence de sels inhibiteurs dans les bouillons). Dans ces conditions, nous préconisons la technique Heatley.

2° L'acide streptomycinique ne précipite plus avec l'acide ribonucléique à pH 7 alors qu'il précipite encore avec la céphaline au même pH. L'acide ribonucléique précipite cependant avec l'acide streptomycinique à pH 4,0.

3° La streptomycine dénaturée par la cystéine ne précipite plus ni avec l'acide ribonucléique ni avec la céphaline.

4° De nouveaux complexes insolubles entre substances à point iso-électrique opposé sont décrits : trypaflavine ou thymohistone de veau nucléotides ou ATP ou antigène somatique et particulièrement trypaflavine (prise comme type de colorant basique) ou streptomycine-acide mycolique. L'action du chlorure de calcium sur les complexes insolubles streptomycine-acide nucléique de levure a également été étudiée.

5° On discute ces résultats et on conclut qu'en tant que bactériostatique, la streptomycine serait un poison de la perméabilité et on rapproche bactériostase et narcose ; la streptomycine pourrait agir comme antidote vis-à-vis du complexe toxique du bacille tuberculeux polysaccharide-acide mycolique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FRIED (J.) et WINTERSTEINER (O.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 79.
- [2] COHEN (S. S.). *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 511.
- [3] BERKMAN (S.) et coll. *J. Bact.*, 1947, **54**, 6.
- [4] GROS (F.) et RYBAK (B.). *Helv. Chem. Acta*, 1948, **31**, 1855.
- [5] RYBAK (B.) et GROS (F.). *Experientia*, 1948, **4**, 396.
- [6] MAY (J. R.), VOUREKA (E. A.) et FLEMING (A.). *Brit. med. J.*, 10 mai 1947, 627.
- [7] GRUMBACH (F.) et BOYER (F.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 52.
- [8] GRUMBACH (F.), RYBAK (B.) et GROS (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 872.
- [9] EULER (H. von) et HELLER (L.). *Arch. Kemi.*, 1948, **26 A**, n° 14.
- [10] GROS (F.), MACHEBOEUF (M.), LACAÏLLE (P.) et RYBAK (B.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 720.
- [11] RYBAK (B.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 351.
- [12] MILLER (B. F.), ABRAMS (R.), DORFMANN (A.) et KLEIN (M.). *Science*, 1942, **96**, 428.
- [13] PITTMANN (M.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 427.
- [14] LINZ (R.). *Rev. Belge Path. Med. Exp., Suppl. III*, 1948, **29**, 78.
- [15] KNAYSI (G.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 113.
- [16] PECK (R. L.) et coll. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, **68**, 29.
- [17] WAKSMAN (S. A.) et SCHATZ (A.). *J. Am. Pharmaceutic. Ass. Scient. éd.*, 1945, **34**, 273.
- [18] FISCHER (E.), HOFFMANN (O.) et PRADO (E.). *Science*, 1944, **100**, 376.
- [19] ABRAHAM (E. P.) et DUTHIE (E. S.). *Lancet*, 1946, **1**, 455.
- [20] TROENDEL. Cité in *La Perméabilité*, E. Gellhorn et J. Régnier. Paris, 1936, 148.
- [21] LABES (R.). *Biochem. Zeitschr.*, 1922, **130**, 14.
- [22] MASSART (L.) et coll. *Experientia*, 1947, **3**, 119.
- [23] JEENER (J.) et BRACHET (J.). *Enzymologia*, 1944, **2**, 222.
- [24] SMITH (D. G.) et WAKSMAN (S. A.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 253.
- [25] DUBOS (R. J.). *The Bacterial Cell*, 1947, Harvard Univ. Press, 89.
- [26] ANDERSON (R. G.). *J. biol. Chem.*, 1929, **85**, 339.

- [27] CHOUCROUN (N.). *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 1757.
- [28] CHOUCROUN (N.). *C. R. Acad. Sci.*, 1940, **240**, 511.
- [29] CHOUCROUN (N.). *Science*, 1943, **98**, 327.
- [30] RAMON (G.) et RICHOU (R.). Consulter par exemple : *Rev. d'Immunol.*, 1948, **12**, 8.

PARENTÉ IMMUNOLOGIQUE ENTRE L'HORMONE CHORIALE HUMAINE ET CERTAINS POLYOSIDES

I. — RÉACTIONS CROISÉES AVEC LES POLYOSIDES DE GROUPES SANGUINS, DU PNEUMOCOQUE ET DU *BACILLUS ANTHRACIS*

par A. EYQUEM et A. BUSSARD (*).

(Services de M. R. DUJARRIG DE LA RIVIÈRE et de M. GRABAR.
Institut Pasteur, C. N. R. S.)

Au cours de recherches antérieures [1], nous avons constaté l'existence d'une réaction croisée dissymétrique entre la gonadotrophine choriale humaine et les substances de groupes sanguins. Certains sérums de lapins immunisés à l'aide de globules rouges humains du groupe A présentent une activité antigonadotrope chez la rate impubère, et précipitent spécifiquement l'hormone choriale humaine ; par contre, le sérum antigonadotrophine ne présente qu'une faible activité anti-A.

Connaissant la similitude des structures chimiques du polyoside caractéristique du groupe A et des polysides du pneumocoque type XIV et du *Bacillus anthracis*, il était loisible de prévoir l'existence de réactions croisées entre les différentes catégories d'antigènes et d'anticorps.

On sait, en effet, depuis les travaux de Finland et Curnen [2] et de Lewine et ses collaborateurs [3], que certains globules rouges humains sont plus particulièrement agglutinés par le sérum anti-pneumocoque XIV, par suite de la formation d'une agglutinine anti-A, dans le sérum de lapin anti-pneumocoque XIV et d'une agglutinine anti-A₂ dans le sérum de cheval, ces agglutinines étant absorbables par le polyoside spécifique du pneumocoque XIV.

Ivanovics [4] a poursuivi ces recherches et constaté que le sérum de cheval anti-*Bacillus anthracis* agglutine les pneumocoques du type XIV, le polyoside spécifique de ce type pouvant absorber les précipitines anti-*B. anthracis*. La substance spéci-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 avril 1949.

fique du groupe sanguin A est aussi précipitable par ce sérum, mais seulement lorsqu'elle est partiellement hydrolysée.

L'explication de ces réactions croisées a été fournie par l'étude de l'antigène commun, qui s'est révélé être un polyoside composé de N-acétylglucosamine et de galactose, et qui a été l'objet de différentes études, dont les plus récentes sont celles de W. T. J. Morgan et de Kabat. Ce dernier a signalé [5] que l'hydrolyse des substances spécifiques de groupe sanguin d'origine porcine augmente la précipitabilité par le sérum anti-pneumocoque XIV, au fur et à mesure de la libération du fucose.

L'hormone choriale humaine étant considérée actuellement comme un glucoprotéide dont la partie glucidique serait formée d'éléments trisaccharidiques comportant une molécule d'hexosamine [7, 8, 9], nous avons été amenés à examiner de plus près les parentés immunologiques entre l'hormone choriale humaine, les antigènes de groupe sanguin, les polyosides du pneumocoque XIV et du *B. anthracis*.

TECHNIQUES ET MATÉRIEL.

A. ANTIGÈNES. — L'hormone gonadotrope utilisée est extraite d'un mélange d'urines de femmes enceintes, de groupes sanguins connus dans certains cas ; elle possède un titre de 1.000 U. I. par milligramme.

La substance spécifique du groupe sanguin A a été extraite de la muqueuse gastrique de porc (de groupe sanguin A) par la technique de Morgan ; un échantillon purifié, d'origine humaine, nous a été fourni par le professeur W. T. J. Morgan.

Le polyoside spécifique de pneumocoque type XIV nous a été fourni par le professeur M. Heidelberger.

Le polyoside du « *B. anthracis* » nous a été fourni par le Dr H. N. Rydon, il a été préparé par la méthode d'Ivanovics.

La souche de « *Diplococcus pneumoniae* » type XIV, étudiée par M. Cotoni, qui en a vérifié les caractères, provient du service de M^{re} Mörch, de l'Institut de Sérothérapie danois.

B. ANTISÉRUMS. — Les sérums antihormones sont obtenus par immunisation d'animaux pendant deux à trois mois, à l'aide d'hormone adsorbée sur alumine, injectée dans certains cas par voie intraveineuse et par voie sous-cutanée dans d'autres. Chaque animal reçoit, au cours de l'immunisation, une dose totale variant de 2.400 à 4.000 U. I. Certains lapins ont été splénectomisés avant immunisation, ils n'ont été inoculés qu'après avoir retrouvé leur équilibre physiologique. Chez tous les animaux inoculés, nous avons effectué un prélèvement du sérum avant immunisation ; ce sérum nous a servi de témoin au cours de toutes les réactions.

Le sérum anticharbonneux nous a été fourni par M. Staub. il provient d'un âne immunisé par injections intraveineuses de cultures vivantes de bactériidies acapsulées [10].

Les sérums antipneumocoques nous ont été fournis en partie par le professeur Heidelberger, en partie par le Dr Cotoni.

Les sérums anti-A ont été préparés chez des lapins, coqs, chiens, boucs, suivant le protocole indiqué précédemment [1], ou par immunisation de sujets des groupes O et B à l'aide de substances du groupe sanguin A d'origine humaine. Signalons que nous avons immunisé sans résultat 2 singes adultes de l'espèce *Cynomolgus*, à l'aide d'injections intraveineuses de substance A d'origine porcine. De même, l'immunisation de 5 lapins à l'aide de substance A incorporée au mélange adjuvant de Freund n'a pas permis d'obtenir d'anticorps anti-A sous forme d'agglutinine complète ou bloquante.

C. RÉACTIONS ANTIGÈNE-ANTICORPS. — Les réactions de précipitation ont été réalisées à l'aide de la méthode du disque (Ring-test) dans des tubes semi-capillaires à 20°, la lecture étant faite toutes les trente minutes pendant les quatre heures qui suivent.

L'épreuve d'agglutination des pneumocoques a été exécutée à l'aide de suspensions de bactéries cultivées sur milieu à base de viande ayant subi une digestion papaïnique, ne contenant pas de pepsine ni de substance A d'origine porcine ou bovine. Nous avons vérifié, dans chaque cas, que ce milieu de culture ne présentait pas de pouvoir inhibiteur vis-à-vis du sérum agglutinant anti-A ; on ne peut donc faire intervenir l'absorption d'antigène A par les pneumocoques pour expliquer certains de nos résultats.

L'activité protectrice « in vivo » des sérums vis-à-vis de l'hormone gonadotrope a été dosée par la réaction du tractus génital de la rate impubère ; 5 animaux étaient utilisés pour une dose donnée. L'activité indiquée est exprimée en unités antigonadotropes par centimètre cube, c'est-à-dire la quantité d'unités internationales (standard international du National Institute for Medical Research Londres), neutralisées par 1 cm³ de sérum administré par voie sous-cutanée trente minutes avant l'hormone.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET DISCUSSION.

Nous présenterons les résultats obtenus en 2 paragraphes :
Activité immunochimique croisée des sérums antigonadotropes et activité antigonadotrope des sérums antibactériens.

A. ACTIVITÉ IMMUNOCHEMIQUE CROISÉE DES SÉRUMS ANTIGONADOTROPES. — Après examen des tableaux I et II, qui résument les résultats des expériences, nous constatons que, sur 33 sérums antigonadotropes, 24 possèdent le pouvoir d'agglutiner les sus-

TABLEAU I. — Activités antipneumocoque et anticharbon de sérums antagonodotropes (lapins immunisés par voie intraveineuse).

NUMÉRO des Lapins	MODE D'IMMUNISATION	ACTIVITÉ antigonodotrope <i>in vivo</i> Unités anti/cm ³	ACTIVITÉ ANTIPNEUMOCOQUE XIV				ACTIVITÉ anticharbon	
			Agglutination		Précipitation		Avant	Après
			Avant	Après	Avant	Après		
IX'. Mélange . .	Sérums épuisés par extraits urinaires banaux humains.	200	0	0	0	0	++	
X'. Mélange . .		< 50	0	+	0	+	0	
XIII. Mélange.		100	0	++	0	+	0	
672.			0	+++	0	0	0	
673.			0	+++	0	0	0	
674.	Voie intraveineuse.		0	+++	0	0	0	
675.			0	+++	0	0	0	
677.			0	+++	0	0	0	
678.			0	+++	0	++	0	
679.			0	+++	0	++	+	
Proportion des sérums réagissants			0/10	9/10	0/10	4/10	0/6	5/7
653.	Voie intraveineuse. Lapins splénectomisés.	Le mélange à parties égales titre 10-30.	0	++	0	0	0	0
654.			0	0	0	0	0	0
655.			0	+	0	0	0	0
656.			0	+	0	0	0	0
657.			0	0	0	0	0	++
Proportion des sérums réagissants			0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	4/5

TABLEAU II. — Activités antipneumocoque et anticharbon de sérums antagonisotropes
(Lapins immunisés par voie sous-cutanée et autres animaux).

NUMÉRO des lapins	MODE D'IMMUNISATION	ACTIVITÉ antigénodotrope <i>in vivo</i> Unités anti/cm ³	ACTIVITÉ ANTIPNEUMOCOQUE XIV				ACTIVITÉ anticharbon	
			Agglutination		Précipitation		Avant	Après
			Avant	Après	Avant	Après		
A 52			0	++	0	0	0	++
XIV			0	0	0	+	0	0
681	Voie sous-cutanée. 2 mois immunisation.	50-75	0	±	0	+	0	0
682			0	++	0	+	0	0
683			0	0	0	+	0	0
684			0	±	0	+	±	++
685			0	±	0	+	±	++
687			0	±	0	0	0	0
688			0	±	0	0	0	0
Proportion des sérums réagissants			0/9	7/9	0/9	7/9	0/8	3/8
664	Voie sous-cutanée. Lapins splénectomisés	En mélange par parties égales. 100-150	0	0	0	0	0	0
667			0	±	0	+	0	0
668			0	0	0	0	0	0
669			0	0	0	0	0	+
Proportion des sérums réagissants			0/4	4/4	0/4	4/4	0/4	4/4
Coeq doré	Voie intraveineuse. 4 mois immunisation.	< 10 > 100 10 10	0	±	+	+	0	++
Coeq gris			0	0	0	+	0	++
Bouc			0	+	0	+	0	++
Cheval 470			0	++	0	+	0	++
Cheval 784			0	++	0	+	0	++

pensions de pneumocoque XIV, les sérums correspondant avant immunisation étant inactifs.

Les réactions de précipitation du polyoside XIV, moins fréquemment positives, sont concordantes dans 11 cas. Parmi ces 11 sérums, 9 précipitent également le polyoside du *B. anthracis*. D'autre part, 4 sérums agglutinant le pneumocoque XIV précipitent le polyoside du *B. anthracis*; 5 sérums présentent un faible pouvoir agglutinant vis-à-vis du pneumocoque XIV, sans autre propriété vis-à-vis des polyosides bactériens. Dans 6 cas seulement, nous avons obtenu des réactions positives isolées.

Par ailleurs, si nous examinons la correspondance entre le taux d'activité antihormonale et l'existence des agglutinines et précipitines bactériennes, nous constatons que la concordance n'est pas complète. C'est ainsi que les sérums de lapins ayant le plus haut titre antigonadotrope (IX', XIII, XIV, 664, 667, 668, 669) n'ont qu'un faible pouvoir précipitant ou agglutinant. Si nous examinons les résultats obtenus, en fonction de la voie d'immunisation utilisée, nous constatons que c'est dans le cas d'animaux normaux immunisés par voie intraveineuse à l'aide d'hormone gonadotrope que nous obtenons les sérums les plus actifs au point de vue agglutination et précipitation d'antigènes bactériens. La splénectomie préalable diminue cette activité. L'utilisation de la voie sous-cutanée pour l'immunisation aboutit à des résultats identiques; dans ce dernier cas, la splénectomie préalable ne provoque pas de modification aussi sensible des résultats.

B. ACTIVITÉ ANTIGONADOTROPE DES SÉRUMS ANTIBACTÉRIENS. —

L'activité antigonadotrope d'un certain nombre de sérums antibactériens a été étudiée à l'aide de la réaction de précipitation de l'hormone dans tous les cas, et dans certains cas physiologiquement. Malheureusement, le nombre d'animaux nécessaires à chaque test physiologique étant assez important, nous n'avons pas encore pu étudier, du point de vue physiologique, un nombre suffisant de sérums.

Nous avons constaté que les 2 sérums de lapin antipneumocoque du type XIV à notre disposition présentent un pouvoir antigonadotrope compris entre 10 et 20 unités internationales (tableau III).

Un sérum de cheval anti-pneumocoque XIV et un sérum d'âne anticharbonneux, présentaient un pouvoir précipitant non associé à une activité physiologique antigonadotrope.

Nous avons cherché, dans le cas du sérum de cheval 618, à préciser la zone d'équivalence en unités d'hormones, en effectuant l'étude du liquide surnageant après précipitation. Nous avons constaté que le taux d'activité du sérum est de l'ordre de 1 U. I.

TABLEAU III. — Activités antihormone, antigroupes sanguins, et antipolyoside C des sérums antipneumocoques.

SÉRUMS	ACTIVITÉ antigonadotrope		ACTIVITÉS antigroupes sanguins			POLYOSIDE C
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> Unités anti/cm ³	A	B	O	
Lapin n° 1 antipneumocoque XIV .	0	10-20	1/128	1/4	1/2	±
Lapin n° 2 antipneumocoque XIV .	0	10	1/32	1/32	1/32	+
Cheval 618 antipneumocoque XIV .	+	0	1/256	1/256	1/256	+
Ane anticharbon	+	0	1/2	0	0	++

par centimètre cube, c'est-à-dire assez faible, relativement au taux des sérums de lapins antigonadotropes.

Dans le but d'apprécier l'importance des réactions croisées qui nous ont été révélées, nous avons étudié les effets de l'absorption de certains de ces sérums à l'aide d'antigènes ou de polyosides spécifiques.

Nous avons ainsi constaté que l'absorption du sérum de cheval antipneumocoque XIV par les globules rouges A ne permet pas d'enlever les anticorps précipitant l'hormone. A ce sujet, rappelons que dans les expériences de Beeson et Gœbel [41], l'absorption de sérum anti-Pn XIV à l'aide de globules rouges A n'enlevait pas les agglutinines anti-Pn XIV, alors que la substance spécifique de groupe sanguin A était capable d'absorber 50 p. 100 des anticorps anti-Pn XIV. Ceci permet à Kabat de conclure ([6], p. 235) que, dans le cas du sérum anti-Pn XIV, ce n'est pas la même fraction qui agglutine les globules rouges A et qui précipite la substance A.

Quoi qu'il en soit, la précipitabilité de l'hormone par le sérum anti-Pn XIV n° 618 était quantitativement trop peu importante pour que l'on puisse espérer constater des différences appréciables entre les précipités obtenus avec le polyoside homologue avant et après épuisement par l'hormone. Cependant, l'exécution de ces réactions d'absorption est restée encore limitée du fait de la faible quantité de produits purifiés dont nous disposions, surtout dans le cas des antigènes microbiens solubles.

Dans le but de rechercher si les réactions signalées n'étaient pas dues à l'intervention de l'antigène Forssman, nous avons examiné le pouvoir antigonadotrope de sérums de lapins immunisés avec des organes contenant l'antigène Forssman : reins et foie de cobayes, reins et foie de souris, globules rouges de mouton, suspensions de *Shigella dysenteriae* ou *Salmonella paratyphi* B. En aucun cas nous n'avons constaté d'effets antigonado-

tropes avec ces sérums. Nous avons, de même, obtenu des résultats négatifs avec le sérum de sujets ayant présenté une réaction sérique après injection de sérum de cheval (ou avec le sérum de malades atteints de mononucléose infectieuse, avec réaction de Paul et Bunnell positive au 1/8.000). D'autre part, le taux d'agglutination d'une suspension de bacilles de *Shiga* par des sérums de lapins antigonadotropes n'est pas plus élevé que celui des sérums prélevés avant immunisation.

Enfin, le fait que le sérum de cheval antigonadotrope soit actif, et on sait que cet animal est porteur de l'antigène Forssman, peut permettre d'écarter l'intervention de cet antigène dans les réactions croisées signalées.

D'autre part, nous avons recherché si, injectés seuls à forte dose, les antigènes microbiens donnant les réactions croisées signalées provoquaient une réaction du tractus génital de la rate impubère. A la dose de 0,5 mg. par animal, le polyoside du pneumocoque type XIV est sans action sur la rate impubère. Le précipité spécifique : polyoside pneumocoque XIV-antisérum homologue (0,1 mg. d'antigène-1 cm³ de sérum) est, lui aussi, dépourvu d'activité.

L'étude chez la souris de l'activité protectrice de sérums antigonadotropes vis-à-vis de culture virulente de Pn XIV ne nous a pas encore permis d'aboutir à des résultats concluants.

Nous poursuivons, actuellement, des essais de protection de lapins contre l'injection de suspensions de *Bacillus anthracis* vivants, à l'aide de sérums antigonadotropes précipitant le polyoside charbonneux. Mais nous ne devons pas, cependant, perdre de vue le fait que les anticorps précipitant le polyoside C du *Bacillus anthracis* ne sont pas protecteurs.

De toute manière, il est nécessaire, avant de conclure, d'examiner un nombre plus important de sérums de lapins anti-Pn XIV. Mais connaissant, depuis les constatations de Witebsky et ses collaborateurs [12], la possibilité d'absorber le sérum anti-A à l'aide du polyoside du Pn I, cette étude devra être complétée par la recherche des similitudes antigéniques entre l'hormone et les différents types de pneumocoques.

CONCLUSION.

1° a) Les sérums antigonadotropes présentent fréquemment une activité anti-Pn XIV et anti-charbon. Il n'y a pas parallélisme entre le pouvoir physiologique antigonadotrope et l'activité anti-Pn XIV et anti-charbon.

b) Cette réaction croisée ne semble pas être absolument réciproque, puisque les sérums anti-Pn XIV et les sérums anti-charbon examinés sont peu antigonadotropes.

Ces réactions ne sont pas dues à l'antigène Forssman.

2° a) Les sérums antigonadotropes ne présentent qu'une faible agglutinine anti-A.

b) Les sérums anti-A ne sont qu'exceptionnellement antigonadotropes (*in vivo* et *in vitro*).

3° a) Le sérum anti-charbonneux précipitant examiné ne possède pas d'agglutinine anti-A.

b) Le polyoside du charbon n'absorbe pas les agglutinines anti-A d'un sérum de lapin anti-A.

De l'ensemble de ces résultats, on pourrait conclure à une parenté antigénique plus étroite entre l'hormone gonadotrope et les polyosides du Pn XIV et du charbon, qu'entre l'hormone et le polyoside du groupe sanguin A, cette parenté correspondant à une similitude chimique plus étroite.

Ces quelques essais n'ont été possibles que grâce à l'amabilité des professeurs M. Heidelberger, W. T. J. Morgan, du Dr Cotoné, de M. Staub et du Dr Rydon. Nous les prions de recevoir tous nos remerciements pour l'aide qu'ils nous ont fournie.

RÉSUMÉ.

1° L'étude des sérums d'animaux immunisés à l'aide de l'hormone gonadotrope chorale humaine nous a permis de constater qu'une proportion importante de ces sérums présente la propriété d'agglutiner les suspensions de *Diplo. pneumoniae* du type XIV, de précipiter le polyoside spécifique de type de cette bactérie, ainsi que le polyoside C du *Bacillus anthracis*. Cependant, la concordance entre ces différentes propriétés et le taux antigonadotrope n'est pas complète.

2° Parmi les sérums dont nous avons étudié le pouvoir antigonadotrope, nous avons constaté que 2 sérums de lapins anti-pneumocoque XIV présentent une activité décelable.

3° Les rapports immunologiques semblent plus étroits entre l'hormone gonadotrope chorale humaine et le polyoside du pneumocoque XIV qu'entre l'hormone et les autres polyosides du groupe sanguin du *B. anthracis*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BUSSARD (A.) et EYQUEM (A.). Ces *Annales*, 1947, **73**, 1194.
- [2] FINLAND (M.) et CURNEN (E. C.). *J. Immunol.*, 1940, **38**, 457.
- [3] LEWINE, BULLOWA et KATZIN. *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1937, **41**, 617.
- [4] IVANOVICS. *Zeit. Immun.*, 1940, **98**, 373.
- [5] KABAT (E.), BENDICH (A.), BEZER (A.) et KNAUB (V.). *J. exp. Med.*, 1948, **87**, 295.

- [6] KABAT (E.) et MAYER (M.). *Experimental Immunochimistry*, Thomas, 1948.
- [7] MEYER (K.) et KURZROCK (R.). *Endocrines in Obstetrics*, 1937, 115.
- [8] GURIN (S.), BACHMAN (G.) et WILSON (D. W.). *Science*, 1939, **89**, 62.
- [9] GURIN (S.). *Proceed. Soc. exp. Biol. Med.*, 1942, **49**, 48.
- [10] STAUB (A.), LAMY (R.) et VIRAT (B.). *C. R. Acad. Vétér.*, 1947, **20**, 428.
- [11] BEESON et GOEBEL. *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 239.
- [12] WITEBSKY, NETER, SOBOTKA. *J. exp. Med.*, 1935, **61**, 703.

FRACTIONS PROTIDIQUES ET FORMOL-GÉLIFICATION

par G. MILHAUD

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

En 1920 Gaté et Papacostas [1] découvrirent par hasard que certains sérums syphilitiques se prenaient en gel en présence de formol. On reconnut rapidement par la suite que cette particularité dépassait le cadre de certaines atteintes syphilitiques et s'étendait à de nombreuses maladies parasitaires sévissant hors d'Europe et aux myélomes multiples. Des études plus récentes ont montré que la réaction au formol-gel présente un intérêt certain dans un grand nombre d'affections courantes en Europe et dont le trait commun est de s'accompagner de modifications de l'équilibre protidique du sérum.

Divers auteurs ont essayé de préciser à quelles perturbations des protéines sanguines était liée la formation d'un gel après addition de formol. L'hyperglobulinémie va, pour Kürten [2] et Lloyd et Paul [3], de pair avec une réaction positive. La précipitation des euglobulines suffit à négativer un sérum pathologique (Napier [4]), alors que l'adjonction d'euglobulines à un sérum normal positive ce dernier. Selon Lloyd et Paul [3] une solution d'euglobulines ne réagirait pas en présence de formol, il faudrait lui ajouter des albumines et des pseudoglobulines.

Wise et Gutman [5] ont fait les constatations suivantes : de 35 sérums dont la teneur en globulines est supérieure ou égale à 4 g. p. 100, 34 réagissent en présence de formol en vingt-quatre heures. 52 sérums présentant moins de 3,4 g. p. 100 restent liquides dans les mêmes conditions. Enfin, ceux dont le taux de globulines est compris entre ces deux valeurs donnent des résultats variables. Pour de Vries [6] la réaction serait généralement négative quand le taux de globulines est inférieur à 3,6 g. p. 100 et positive au-dessus de 3,7 g. p. 100.

Le fibrinogène joue un rôle important dans le processus de la gélification (Nicolas [7]) ; pour Chopra et coll. [8] il s'agirait d'une réaction de fibrino-globulines dont le point iso-électrique de 6,8 est voisin du pH 7, qui serait celui de la prise en gel. Mais nous savons aujourd'hui que les pH des points iso-électriques du fibrinogène et des globulines sont notablement plus bas.

Vershure [9], dont le travail nous parvient en dernière heure, prétend qu'une teneur en γ -globulines supérieure à 2,6 g. p. 100

produit une prise en gel, ce qui correspond à une forte augmentation du taux de celles-ci puisque la valeur normale se trouve vers 0,8 g. p. 100.

Enfin, l'inactivation du sérum maintenu à 56° pendant une demi-heure accélérerait la réaction pour les uns (Kürten [40]), la ralentirait pour d'autres (Mayr [41]) et serait sans importance pour Gaté et Papacostas [4].

Ces résultats, parfois contradictoires, ont été obtenus par des méthodes différentes et partiellement démodées. Nous avons pensé qu'il serait utile de reprendre une étude serrée de la réaction au formol.

FRACTIONS PROTIDIQUES GÉLIFIABLES. — Notre propos a été de déterminer le ou les constituants du plasma susceptibles de donner un gel avec le formol.

La méthode de séparation du plasma que Cohn et coll. [12] ont mise au point durant la guerre permet d'obtenir des fractions de composition définie. L'alcool éthylique, plus ou moins étendu d'eau, précipite à basse température et à divers pH des protéines non dénaturées, la force ionique demeurant faible. Ces fractions mises en solution devaient se comporter différemment vis-à-vis du formol et permettre de déterminer celles qui étaient responsables de l'apparition du gel. De plus, on pouvait, grâce à elle, reconstituer à partir de sérums ou plasmas normaux, des sérums ou plasmas pathologiques. Il devenait possible de trouver les concentrations minima indispensables à une positivation.

D'autre part, quelques auteurs ont décrit une inhibition exercée par certaines composantes plasmatiques sur celles qui pouvaient donner une réaction révélant un déséquilibre protidique. Ainsi, la vitesse de sédimentation est ralentie par la présence d'albumine.

Gros [13] a montré que l'albumine avait un effet colloïdo-protecteur, dont la réduction en cas d'hypoalbuminémie se manifestait par une réaction de Takata-Ara positive. Les études de Hanger [14] sur la floculation à la céphaline-cholestérine abondent dans ce sens ; de même les albumines d'un sérum normal, comparées à celles d'un malade atteint d'hépatite, peuvent inhiber des tests de floculations syphilitiques (Volkin [15]).

Dans le cas de l'épreuve qui nous occupe, existe-t-il une telle interaction ? La dilution des fractions gélifiables dans celles qui ne l'étaient pas devait permettre de résoudre ce problème, en prenant comme étalon les mêmes dilutions dans du sérum physiologique.

Composition électrophorétique des six fractions de Cohn. — En résumant rapidement l'analyse électrophorétique des fractions de Cohn, dont nous avons conservé la nomenclature originale, on peut dire que [16] :

La fraction I comprend 62 p. 100 de fibrinogène ;

La fraction II + III comprend 53 p. 100 de β -globulines et 37 p. 100 de γ ;

La fraction IV-1 comprend 89 p. 100 de globulines α et 9 p. 100 de β ;

La fraction IV-4 comprend 52 p. 100 de globulines α et 42 p. 100 de β ;

La fraction V comprend 97 p. 100 d'albumines.

La composition de ces fractions ne varie pratiquement pas d'un fractionnement à l'autre, si l'on se tient scrupuleusement aux conditions expérimentales fixées par Cohn et ses coll.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

FRACTIONNEMENT DU PLASMA HUMAIN. — On utilise un plasma (1) contenant, par litre, 100 cm³ de citrate à 4 p. 100. La conservation à la glacière permet de maintenir le pH à 7,4.

Fraction I (fibrinogène). — Le plasma est agité lentement tandis qu'il est refroidi à 0°, en prenant soin d'éviter la formation de glace. On ajoute alors, par litre de plasma, 177 cm³ d'alcool éthylique à 53,3 p. 100 (d. 0,9198 à 25°/eau 4°) et 1 cm³ d'un tampon à l'acétate 0,8 m de pH 4, pour arriver à une concentration en alcool de 8 p. 100 et à un pH de $7,2 \pm 0,2$. L'addition se fait goutte à goutte en agitant et requiert une heure et demie, alors que la température tombe à $-2,5^\circ$. Le fibrinogène précipite et on le sépare par centrifugation à -2 ou -3° . Cette fraction I se conserve quelques mois à -5° .

Fraction II + III (β et γ -globulines). — Le liquide surnageant est amené à une concentration en alcool de 25 p. 100 et au pH 6,9. On utilise à cet effet, par litre de liquide centrifugé, 601 cm³ d'alcool à 53,3 p. 100 préalablement refroidi à -5° , et le mélange de 0,88 cm³ d'acide acétique 10 m, de 0,44 cm³ d'acétate de Na 4 m et de 2,30 cm³ d'éthanol à 95 p. 100 (mesurés à 25°). Le temps d'addition est de cinq heures. La fraction II + III précipite ; elle est centrifugée à -5° .

Fraction IV-I (α -globulines). — Le liquide surnageant est porté, en deux étapes, à un pH de 5,2 et à une concentration en alcool de 18 p. 100.

1° On fait tomber goutte à goutte, en l'espace de une heure et demie, 311 cm³ d'eau à 0° par litre de liquide surnageant, préalablement refroidi à -5° .

2° Puis on ajoute 78 cm³ d'eau à 0° contenant suffisamment de

(1) Nous tenons à remercier vivement le colonel Juillard, du Service central de Transfusion et de Réanimation de l'Armée (Clamart), qui a mis gracieusement à notre disposition 1 lit. 1/2 de plasma et 1/2 litre de sérum.

tampon pour abaisser le pH à $5,2 \pm 0,2$. La quantité de tampon nécessaire est déterminée auparavant par titrage en mesurant le pH à l'électrode de verre à 25° , après dilution suffisante pour éviter l'interférence de l'alcool. Cette addition nécessite une heure environ, la température étant maintenue à -5° . Puis on agite encore pendant une heure et abandonne huit heures à -5° . La fraction IV-1, formée d' α -globulines, précipite complètement, elle est séparée par centrifugation à -5° .

Fraction IV-4 (α - et β -globulines). — Le liquide centrifugé est alors porté au pH de $5,80 \pm 0,05$ et à une concentration de 40 p. 100 d'alcool. A cet effet, on ajoute d'abord durant une heure et demie, à la température de -5° , le tampon nécessaire (on obtient généralement le pH désiré à l'aide de 1,14 g. de bicarbonate de sodium et de 7,9 cm³ d'acétate de sodium 4 m dans 77 cm³ d'eau), puis 456 cm³ d'alcool à 95° , refroidi également à -5° . La fraction IV-4 précipite : elle est centrifugée à -5° .

Fraction V (albumines). — Le liquide surnageant est filtré en suspendant 0,5 p. 100 de supercel lavée, et, pour obtenir la fraction V, on abaisse le pH à 4,8 en maintenant le taux d'alcool à 40 p. 100 et la température à -5° . On fait tomber goutte à goutte durant deux heures et en agitant la solution suivante : 5 cm³ d'acide acétique 10 m, 2,5 cm³ d'acétate de sodium 4 m, 10,5 cm³ d'alcool à 95° et 7 cm³ d'eau, par litre de liquide filtré. On abandonne trois heures sans agitation puis on centrifuge entre -5° et -6° . Le liquide surnageant qui représente la fraction VI contient 1 p. 100 de protéines. La purification du culot de centrifugation — fraction V — comprend sa dissolution dans 6 volumes d'eau à 0° et l'addition, en deux heures, de 1 volume d'alcool à 53,3 p. 100, la température tombant à -2° — -3° . On agite encore durant deux heures et on filtre. Le filtrat est amené, par du bicarbonate, au pH 5,2 (mesuré à l'électrode de verre), puis on ajoute, par litre, en deux heures, à la température de -5° , 545 cm³ d'alcool froid à 95° . On centrifuge entre -5° — -6° . Cette fraction contient presque toutes les albumines avec moins de 3 p. 100 de globulines α et 0,5 p. 100 de globulines β .

FRACTIONS PROTIDIQUES GÉLIFIABLES. — Les protéines fractionnées se présentent à froid sous forme d'une masse cireuse, blanche à l'exception de la fraction IV-1 qui est jaunâtre. Pour étudier le comportement de ces protéines nous les avons dissoutes dans du sérum physiologique. A cet effet, on met en suspension dans un tube à centrifuger contenant une solution de NaCl à 8 p. 1.000 une certaine quantité de la fraction étudiée. On abandonne une demi-heure à la température ambiante pour assurer une bonne solubilisation, puis on centrifuge. Le culot de centrifugation est rejeté.

La détermination du taux des protides dissous fut faite par précipitation avec un mélange d'acétone-alcool.

Nous avons fait les expériences suivantes :

1° Nous avons ajouté à du plasma et à du sérum normaux, ne prenant pas en gel après addition de formol, des quantités croissantes des fractions I à V, pour déterminer, en essayant de les reconstituer, les conditions d'apparition du gel ;

2° En diluant dans du sérum physiologique les fractions responsables de la gélification, nous avons déterminé approximativement le taux minimum de chacune d'elles donnant encore une réaction positive ;

3° En diluant progressivement les fractions gélifiables dans celles qui ne l'étaient pas, nous avons essayé, par comparaison avec les expériences précédentes, de mettre en évidence une éventuelle inhibition de la formation du gel par ces dernières.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION. — La réaction au formol-gel est extrêmement simple. A 1 cm³ de sérum introduit dans un tube à essai de dimensions appropriées (1,5 × 5 cm.), on ajoute 11 gouttes de formol à 35 p. 100, neutralisé avant l'emploi par de la soude caustique diluée, en présence de méthyle orange. Cette neutralisation n'est d'ailleurs pas indispensable en pratique. Nous nous y sommes tenu pour exécuter nos expériences dans des conditions exactement reproductibles, le formol du commerce ayant une acidité variable. Le gel peut apparaître au bout de quelques minutes, exceptionnellement il est vrai. Un laps de temps de vingt-quatre à quarante-huit heures est nécessaire dans la majorité des cas. Passé ce délai, la réaction est considérée comme négative.

GÉLIFICATION PAR ADDITION DE FIBRINOGENÈ (fraction I), PUIS DE FORMOL. — Une solution de la fraction I pure (20 mg. par centi-

FRACTION I + 1 CM ³ DE PLASMA					FRACTION I + 1 CM ³ DE SÉRUM				
Fraction I		Lecture			Fraction I		Lecture		
cm ³	mg.	après 2 h.	après 28 h.	après 48 h.	cm ³	mg.	après 2 h.	après 16 h.	après 48 h.
0	0	—	—	—	0	0	—	—	—
0,1	2	—	+	+	0,1	4	—	—	—
0,2	4	+	+	+	0,2	8	—	—	+
0,3	6	+	+	+	0,3	12	—	+	+
0,4	8	+	+	+	0,4	16	+	+	+
0,5	10	+	+	+					

Température : 20°.

mètre cube), constituée en majeure partie de fibrinogène, se prend en gel en deux minutes.

FRACTION I + 1 CM ³ DE PLASMA				FRACTION I + 1 CM ³ DE SÉRUM			
Fraction I		Lecture		Fraction I		Lecture	
cm ³	mg.	après 1½ h.	après 2½ h.	cm ³	mg.	après 1½ h.	après 2½ h.
Température : 37°.							
0	0	—	—	0	0	—	—
0,1	1,8	+	+	0,1	1,8	—	—
0,2	3,6	+	+	0,2	3,6	—	+
0,3	5,4	+	+	0,3	5,4	+	+
0,4	7,2	+	+	0,4	7,2	+	+
0,5	9,0	+	+	0,5	9,0	+	+

Nous tirons de ces expériences les conclusions suivantes :

- 1° Le fibrinogène donne un gel en présence de formol ;
- 2° Le plasma enrichi de fibrinogène se gélifie plus rapidement que le sérum traité de la même façon ;
- 3° L'élévation de température à 37° favorise la formation du gel.

GÉLIFICATION PAR ADDITION DE β - et γ -GLOBULINES (fraction II + III), PUIS DE FORMOL. — Une solution pure de la fraction II + III, mélange de β - et γ -globulines (50 mg. par centimètre cube), se prend deux fois plus lentement qu'une solution de fibrinogène de concentration deux fois plus faible.

Conclusions :

1° Le plasma se prend en gel après qu'on y a ajouté trois fois moins de globulines qu'au sérum ;

2° Une élévation de température favorise la réaction.

La fraction IV-1 est essentiellement formée de globulines α . L'addition de 5 à 50 mg. dissous dans du sérum physiologique se révéla incapable de faire prendre en gel un sérum et un plasma normaux, et cela aussi bien à 20° qu'à 37°. Même en prolongeant l'expérience pendant soixante-quatre heures, la seule modification fut l'apparition d'un trouble. Une solution de cette fraction dans du sérum physiologique (100 mg par centimètre cube) ne se prend en gel qu'après trente-six heures. On voit donc que les α -globulines réagissent avec une très grande lenteur, même en solution pure et très concentrée.

La fraction IV-4 est un mélange en parties à peu près égales de

FRACTION II + III + 1 CM ³ DE PLASMA				FRACTION II + III + 1 CM ³ DE SÉRUM	
Fraction II + III		Lecture		Lecture	
cm ³	mg.	après 16 h.	après 48 h.	après 16 h.	après 48 h.
<i>Température : 20°.</i>					
0	0	—	—	—	—
0,1	5	—	+	—	—
0,2	10	+	+	—	—
0,3	15	+	+	—	+
0,4	20	+	+	+	+
0,5	25	+	+	+	+
<i>Température : 37°.</i>					
0	0	—	—	—	—
0,1	5	+	+	—	—
0,2	10	+	+	—	+
0,3	15	+	+	+	+
0,4	20	+	+	+	+
0,5	25	+	+	+	+

globulines α et β et contient en outre 1/6 d'albumines. En solution physiologique additionnée de sérum ou de plasma, en quantité variant de 2,2 à 22 mg. par centimètre cube, aucun gel ne se prit, ni à 20° ni à 37°, même après soixante-quatre heures. Une solution pure de cette fraction (28 mg. par centimètre cube) ne gélifia pas non plus. Les concentrations employées étaient, il est vrai, plus faibles que pour les fractions II + III et IV-1, du fait d'une solubilité plus faible.

La fraction V est composée essentiellement d'albumines et contient moins de 3,5 p. 100 de globulines : ajoutée en quantité croissante de 3 à 15 mg. à du plasma et à du sérum normaux, elle ne modifia pas leur propriété en présence de formol.

CONCLUSIONS. — Les expériences précédentes nous ont amené à la conclusion que les fractions protidiques responsables d'une réaction positive au formol étaient le fibrinogène ou les γ -globulines. Les réactions négatives des fractions IV-1, IV-4 et V en présence de formol ont permis d'exclure les α -globulines (IV-1), les β -globulines (IV-4) et les albumines (V).

Pour déterminer le seuil d'apparition du gel, nous avons dilué des solutions des deux fractions actives dans du sérum physiologique.

À 20°, la fraction I (fibrinogène) additionnée de formol se prend en gel :

En deux minutes, pour une concentration égale ou supérieure à 1,8 p. 100 ;

En quatorze heures, pour une concentration de 0,32 p. 100.

La concentration de 0,32 p. 100 se trouve encore dans les limites normales. La faible inhibition qu'exercent les albumines sur la prise en gel suffit à empêcher la gélification d'un plasma normal en quarante-huit heures.

A 20°, la fraction II + III (γ - et β -globulines) additionnée de formol se prend en gel :

En cinq minutes, pour une concentration égale ou supérieure à 3,8 p. 100 ;

En quatorze heures, pour une concentration de 1,1 p. 100.

Il ressort de ce qui précède que le fibrinogène se prend en gel à une concentration nettement inférieure à celle du mélange des globulines β et γ .

Il restait à essayer de mettre en évidence une inhibition éventuelle exercée par l'une ou l'autre des fractions ne réagissant pas avec le formol sur celles qui donnaient un gel positif.

A cet effet, nous avons comparé les dilutions progressives de la fraction I (fibrinogène) et de la fraction II + III (globulines β et γ) dans des solutions contenant les fractions IV-1 (α -globulines), IV-4 (α - et β -globulines) et V (albumines) en notant un retard éventuel dans l'apparition de la prise en gel.

Dilution du fibrinogène (fraction I) dans les autres fractions, puis addition de formol ; température 20° :

FRACTION I 24 mg./cm ³ (mg.)	SÉRUM physiologique		FRACTION IV-1 7,5 mg./cm ³		FRACTION IV-4 19 mg./cm ³		FRACTION V 29 mg./cm ³	
	Lecture		Lecture		Lecture		Lecture	
	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.
24	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+
10,6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	—	+
4,6	+	+	—	+	+	+	—	+
3	—	+	—	+	+	+	—	—

On voit que les fractions IV-1 et V sont légèrement inhibitrices de la prise en gel, particulièrement en lisant la réaction après vingt-quatre heures, mais le résultat final n'est pas modifié de façon sensible.

Dilution des globulines β et γ (fraction II + III) dans les autres fractions, puis addition de formol ; température 20° :

FRACTION II + III 76 mg./cm ³ (mg.)	SÉRUM physiologique		FRACTION IV-1 7,5 mg./cm ³		FRACTION IV-4 19 mg./cm ³		FRACTION V 29 mg./cm ³	
	Lecture		Lecture		Lecture		Lecture	
	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.	24 h.	48 h.
76	+	+	+	+	+	+	+	+
50,6	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+
22,6	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+
10	—	+	—	—	—	—	—	—

On voit que les fractions IV-1, IV-4 et V semblent n'exercer qu'une légère inhibition sur l'apparition du gel.

Pour apprécier les résultats obtenus au cours des expériences que nous venons de rapporter, il faut se rappeler que, si les fractions protéiques ne sont pas dénaturées (la préparation des γ -globulines employées en thérapeutique se fait de la même façon), elles ne sont pas des substances pures et proviennent de sangs normaux. Des globulines pathologiques peuvent vraisemblablement apporter quelques modifications quantitatives à ce qui précède.

CONCLUSIONS

Quelles modifications de la formule protidique aboutissent à une prise en gel en présence de formol ?

Notre propos a été de préciser une fois pour toutes le mécanisme exact de la gélification et le degré de spécificité que l'on peut lui reconnaître en utilisant le fractionnement du plasma humain à froid à l'aide de mélanges en proportions diverses d'alcool et d'eau à différents pH, qui fournit des protéines non dénaturées (méthode de Cohn). Nous avons pu établir que :

Le fibrinogène et les γ -globulines sont seuls gélifiables ;

Le gel apparaît pour une concentration nettement plus élevée de γ -globulines que de fibrinogène (séries de dilutions dans du sérum physiologique) ;

Les albumines n'exercent pratiquement pas d'inhibition sur la prise en gel ; en d'autres termes, une hypoalbuminémie ne suffit pas à positiver un sérum, comme c'est le cas pour la réaction de Takata-Ara ;

Un séjour à l'étuve à 40° accélère la réaction.

L'intérêt qui distingue la réaction au formol-gel des nombreux tests de déséquilibre protidiques, qui ont été proposés à la clinique dans un passé récent, réside moins dans l'extrême simpli-

citée de son exécution et de sa lecture que dans sa spécificité vis-à-vis des γ -globulines, lorsqu'elle est pratiquée avec du sérum. L'hyperglobulinémie γ est en effet la perturbation des protides plasmatiques qui est la plus fréquente en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GATE (J.) et PAPACOSTAS. *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 1432.
- [2] KÜRTEH (H.). *Zeitschr. exp. Med.*, 1928, **61**, 494.
- [3] LLOYD (R. B.), NAPIER (L. E.) et PAUL (S. N.). *Indian J. med. Res.*, 1928, **16**, 1065.
- [4] NAPIER (L. E.). *Indian J. med. Res.*, 1921, **9**, 830.
- [5] GUTMAN (A. B.) et WISE (C. R.). *Am. J. med. Sci.*, **194**, 263.
- [6] DE VRIES. *Thèse Amsterdam*.
- [7] NICOLAS (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 669.
- [8] CHOPRA (R. N.), CHAUDURY (S. G.) et DE (N. N.). *Indian J. med. Res.*, 1931, **19**, 423.
- [9] VERSHURE (J. M. C.). *Electrophorese en Serum-vlokkingsreacties*. Scheltema end Holkends Boekhandel, Amsterdam, 1946.
- [10] KÜRTEH (H.). *Bioch. Z.*, 1923, **135**, 536.
- [11] MAYR (J. K.). *Dermat. Z.*, 1928, **53**, 390.
- [12] COHN (E. J.), STRONG (L. E.), HUGHES (W. L.), MULFORD, ASHWORTH, MELIN et TAYLOR. *J. Am. chem. Soc.*, 1946, **68**, 459.
- [13] GROS (W.). *Deutsch. Arch. klin. Med.*, 1935, **177**, 461, et *Z. exper. Med.*, 1937, **101**, 519.
- [14] HANGER (F. M.). *Trans. Assoc. Am. Physisc.*, 1947, **60**, 82.
- [15] VOLKIN, NEURATH (H.), ERICKSON (J. D.) et CRAIG (H. W.). *Am. J. Syph. Gon. ven. Dis.*, 1947, **31**, 397.
- [16] EDSALL (J. T.). *Advances in prot. Chem.*, 1947, **3**, 444 et 459. Ac. press. New-York.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 2 Juin 1949.

Présidence de M. GASTINEL.

PRÉSENTATION D'OUVRAGES

M. Pierre Gastinel : J'ai l'honneur de déposer sur le bureau de la Société de Microbiologie ce *Précis de Bactériologie médicale* qui, malgré son format et son nombre de pages, demeure un *précis*.

En le rédigeant, nous nous sommes assigné plusieurs buts : d'abord, mettre entre les mains de l'étudiant et du médecin un livre donnant les connaissances nécessaires pour comprendre la Pathologie infectieuse. Mais il fallait aussi songer au programme de l'Enseignement complémentaire qui se poursuit dans les Facultés en vue du diplôme d'Université. Enfin, il convenait qu'un ouvrage fût à la disposition de tous ceux qui veulent s'initier sur le plan biologique à la Microbiologie médicale.

Une première partie est consacrée à des éléments introductifs de bactériologie générale et d'immunologie. La deuxième est réservée à des principes de technique et à l'examen de produits pathologiques.

Nous exposons la classification bactériologique américaine et celle de M. Prévot, puis, dans les parties différentes du livre viennent l'étude des microbes classés par genres, celle des spirochètes, des Rickettsia, des ultravirus.

Nous avons surtout voulu insister sur les propriétés qui ont un rôle dans le déterminisme morbide, commandent la physio-pathologie des infections et régissent les moyens à mettre en œuvre pour établir un diagnostic par des procédés directs ou indirects.

L'iconographie provient surtout du service Photomicrographique de l'Institut Pasteur et nous remercions M. Tréfouël d'avoir autorisé cette collaboration. Trois chapitres paraissent sous la signature de leurs auteurs : M. Jude a rédigé l'examen bactériologique des eaux ; M. Demanche, les techniques sérologiques dans la syphilis ; M. Pierre Nicolle a fait l'exposé des bactériophages. Nous leur témoignons notre gratitude.

M. Lebert : Nous sommes heureux de faire hommage à la Société Française de Microbiologie d'un travail intitulé : *Technique actuelle*

d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies récemment sorti des Presses de la « Collection des Travaux de Pathologie Comparée ».

Cet ouvrage comporte un exposé détaillé de la technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies, telle qu'elle est couramment pratiquée au Service des anaérobies de l'Institut Pasteur ; il est divisé en trois chapitres et trois annexes. Dans le premier chapitre se trouvent décrites les techniques de préparation du milieu de base : le bouillon viande-foie, ainsi que celles de tous les autres milieux de culture qui en dérivent ; le deuxième chapitre comprend l'exposé détaillé des manipulations permettant d'arriver à la colonie isolée en partant d'un prélèvement initial contenant un mélange de germes. La « fiche minimum de détermination » établie par A. R. Prévot sert de plan au troisième chapitre, dans lequel on trouvera la marche à suivre pour la mise en évidence des caractères morphologiques, physiologiques, culturaux, biochimiques, sérologiques et pathogènes des germes anaérobies. La confrontation des résultats ainsi obtenus avec les données du *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, de A. R. Prévot, permet une détermination rapide du germe à identifier. Les annexes, enfin, comportent : les tables *Ducloaux* servant à la détermination rapide du type fermentaire d'une bactérie ; l'exposé de la méthode de Behrens et Kley, modifiée pour la recherche précise de la nature des acides provenant de la fermentation bactérienne et enfin le mode de préparation des différents réactifs chimiques utilisés pour les caractérisations biochimiques du germe.

En résumé, cette technique détaillée se présente comme un aide-mémoire qui pourra permettre aux bactériologistes, non initiés aux problèmes de l'anaérobiose, d'aborder, avec confiance, un domaine nouveau pour eux.

John F. Fulton : *Aviation Medicine in its Preventive Aspects*, Oxford University Press, 1948, 14 x 22 cm., 169 pages.

Les conditions du vol moderne ont créé un chapitre nouveau de la physiologie, celui de l'adaptation du corps humain aux vitesses et aux altitudes atteintes par les aéronefs. Ce livre, attrayant et abondamment illustré, dédié à la mémoire des pionniers de la physiologie de l'aviation, Paul Bert, John Scott Haldane, Yandell Henderson et Joseph Barcroft, est la reproduction des leçons faites par l'auteur en 1947 à l'Ecole d'Hygiène et de Médecine Tropicale de Londres.

Dans les chapitres du début, il retrace l'histoire des recherches sur l'acclimatation de l'homme aux hautes altitudes à la lumière des travaux des précurseurs abondamment cités et analysés.

Dans sa partie actuelle, il apporte des documents jusqu'ici inédits sur l'étude physiologique du vol stratosphérique et de l'influence des efforts d'accélération sur les aviateurs, études auxquelles les différents laboratoires alliés ont procédé à l'occasion de la guerre. A cet égard, il apporte aux physiologistes des documents d'une valeur considérable : la lecture et l'étude du livre s'imposera à tous ceux qu'intéresse la question.

P. L.

L. Martin et M. Hynes. — *Clinical Endocrinology*, J. et A. Churchill Ltd. 104, Gloucester Place, London W. 1., 1948, 15,5×22 cm. 206 pages + index 15 pages; 22 figures et 8 planches.

A l'usage des étudiants et des praticiens, les auteurs ont rédigé ce précis qui réunit sous une forme condensée l'état actuel de l'endocrinologie et de l'endocrinothérapie.

Chaque chapitre contient l'essentiel du sujet. On regrettera parfois que les indications thérapeutiques soient formulées d'une façon aussi schématique. Les illustrations sont dans l'ensemble bonnes.

Une bibliographie élémentaire est donnée à la fin de chaque chapitre.
P. L.

G. W. S. Andrews et J. Miller. — *Penicillin and Other Antibiotics*, Todd Publishing Group Ltd., London W. 1., 13×19 cm., 160 pages, 4 planches.

L'ouvrage constitue une excellente revue générale de la pénicilline et autres antibiotiques. L'abondance de la documentation spécialisée sur le sujet, déjà mise à la disposition des chercheurs au cours de ces dernières années, contribue à donner à cette étude un caractère de vulgarisation qui répond du reste au but de la collection dans laquelle elle paraît.

Si tout ce qu'on y trouve présente un très réel intérêt, il est à craindre que les progrès rapides de nos connaissances sur les antibiotiques ne condamnent bientôt l'ouvrage à revêtir un caractère plus historique qu'actuel.

P. L.

Trevor I. Williams. — *An Introduction to Chromatography*, Blackie and Son Ltd, London and Glasgow, 15×22 cm., 100 pages, 8 planches dont 3 en couleurs.

Cet excellent petit livre, clair et bien présenté, expose les principes, la technique et les méthodes de la chromatographie à l'usage des travailleurs de laboratoire.

L'usage de la chromatographie s'est imposé depuis plusieurs années comme une technique précieuse pour la séparation analytique des substances qu'il est difficile d'isoler autrement. Elle est devenue une méthode indispensable dans certaines recherches, telles que l'analyse des colorants, la détermination des amino-acides, la séparation ou la préparation des antibiotiques, etc.

Les travailleurs de laboratoire pourront se familiariser avec les différents procédés d'application usuels ainsi mis à leur portée. Une théorie de la chromatographie et de nombreuses illustrations contribuent à la compréhension du texte qui, malgré son aspect volontairement élémentaire, représente au contraire une des meilleures études qui aient été publiées sur ce sujet.

P. L.

COMMUNICATIONS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RAGE

III. — DE LA PRÉSENCE DE HYALURONIDASE DANS LA BAVE
DE CHIEN NORMAL

par A. BUSSARD, R. BEQUIGNON et R. LAMY.

Des travaux antérieurs nous ayant permis de constater que l'adjonction de bave de chien normal permettait de rendre la rage fixe virulente lorsqu'on l'inoculait par voie sous-cutanée au cobaye (1), et que l'addition de hyaluronidase d'origine testiculaire au virus de la rage fixe permettait de reproduire ce phénomène chez le lapin et le cobaye (2), nous avons alors recherché directement la présence de hyaluronidase dans la bave du chien.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — Nous avons choisi comme test et comme méthode de dosage de l'enzyme la réduction de viscosité de l'acide hyaluronique. Ce test, en effet, est des plus spécifiques puisqu'il correspond, en somme, à la définition même de la hyaluronidase. D'après McClean (3), les trois tests : inhibition de la coagulation de la mucine (M. C. P.), diffusion d'un colorant (D) et réduction de la viscosité (V. R.), présentent des corrélations convenables à condition d'observer certaines précautions.

Nous avons utilisé comme substrat un hyaluronate d'ammonium provenant du cordon ombilical, purifié, en solution à 0,3 p. 100 dans un tampon citrate pH=4,7. Dans ces conditions la viscosité de notre substrat était d'environ deux fois et demie celle de l'eau.

Les mesures ont été effectuées à 30° C dans un viscosimètre de Lecomte du Nouy, Chaix, Vérain, c'est-à-dire un appareil type Couette avec compensation électro-magnétique et lecture galvanométrique. Cet appareil présente l'avantage sur les viscosimètres type Ostwald de permettre l'étude de la cinétique de la réaction de dépolymérisation avec des délais très courts. Les mesures ont été faites toutes les minutes pendant quinze minutes.

La comparaison des résultats obtenus avec cet appareil et avec le viscosimètre Ostwald donne d'ailleurs une bonne corrélation.

L'adjonction de bave, produit qui a une viscosité propre élevée et variable suivant les individus, exige une correction dans les calculs. Cette correction a été apportée en supposant que les viscosités sont des phénomènes additifs. D'ailleurs, pour limiter l'erreur pouvant provenir du fait que cette supposition n'est qu'approchée, nous n'avons fait nos dosages qu'en ajoutant 5 ou 10 p. 100 de bave à la solution d'hy-

(1) R. BÉQUIGNON, R. LAMY et C. VIALAT, ces *Annales*, 1949, **76**, 283-285.(2) R. BÉQUIGNON, A. BUSSARD et C. VIALAT, ces *Annales*, 1949, **76**, 285.(3) D. McCLEAN, *Biochem. J.*, 1943, **37**, 169.

luronate. Le temps correspondant à la réduction de viscosité provoquée par une unité V. R. a été pris, suivant la convention, égal à vingt minutes. Les mesures ayant été effectuées à concentration constante de substrat, les objections apportées par Swyer (4) et coll. à la méthode de réduction de viscosité ne sont plus applicables et nos résultats sont comparables entre eux.

La collecte de bave a été effectuée après administration sous-cutanée de 0,05 g de pilocarpine à chaque chien.

Cette méthode entraîne évidemment un inconvénient grave : suivant la sensibilité individuelle la sécrétion salivaire a pu varier dans de grandes limites et, en conséquence, la dilution de l'enzyme (si celui-ci n'est pas sécrété en concentration proportionnelle par la même glande, ce qui est parfaitement possible). Cet inconvénient limite considérablement la valeur des dosages qui doivent être considérés comme donnant seulement des ordres de grandeur.

RÉSULTATS. — Ils sont consignés sans le tableau suivant.

Activité enzymatique de diverses baves de chiens.

NUMÉRO de l'animal	SEXE	AGE	TRAITEMENT de la bave	ACTIVITÉ V. R. U./cm ³
1		Jeune. 4 ans. 4 ans. 4 ans. 15 ans.	Non traitée.	18
2			Bouillie 10 minutes.	0
3			Non traitée.	0
4			Non traitée.	28
5			Non traitée.	154
6			Non traitée.	22
7			Non traitée.	57
8			Non traitée.	67
9			Conservée	9,5
			2 mois à + 5°.	
			Conservée	12
			2 mois à + 5°.	
1		3 ans. 4 ans. 4 ans. 3 ans.	Non traitée.	Traces.
2			Non traitée.	6
3			Non traitée.	25
4			Conservée	7
			2 mois à + 5°.	
5			Conservée	6
			2 mois à + 5°.	

A l'exception de 2 animaux sur 14 essais, nous constatons la présence indiscutable d'une hyaluronidase dans la salive. L'activité dosée varie dans de grandes limites, lorsqu'on examine la salive dans les vingt-quatre heures qui suivent le prélèvement de 6 à 154 V.R.U./cm³.

L'ébullition de la salive pendant cinq minutes détruit complètement l'activité enzymatique.

La conservation des échantillons à + 5° C semble provoquer une

(4) G. I. M. SWYER et C. W. EMMENS, *Biochem J.*, 1947, **41**, 29.

baisse de l'activité, qui ne peut être que supposée, le dosage avant stockage n'ayant pu être effectué.

Il ne semble pas y avoir de corrélation nette entre l'activité et l'âge du donneur. Quant au sexe, il semblerait que la salive des mâles soit en moyenne plus active que celle des femelles, mais on doit attendre une statistique plus complète, effectuée avec des prélèvements plus physiologiques, pour régler cette question. De toute façon il paraît incontestable que, dans la grande majorité des cas, la bave de chien contient une hyaluronidase.

DISCUSSION. CONCLUSION. — Après avoir décelé la présence de hyaluronidase dans la bave du chien normal, il nous paraît raisonnable de conclure que c'est cette substance qui rend la morsure du chien enragé particulièrement virulente et qui permet au virus de diffuser à travers le conjonctif jusqu'aux terminaisons nerveuses.

Il semble bien, d'autre part, que la bave ne contienne pas d'acide hyaluronique. Bien que dans sa revue générale (5), Duran-Reynals ne signale pas de recherche de l'acide dans la bave, le fait que celui-ci soit absent de la mucine gastrique et nasale plaide en faveur de son absence dans la bave. Nous avons d'ailleurs constaté que les viscosités propres des salives ne diminuaient pas sensiblement au bout de plusieurs jours de conservation. Le paradoxe de la présence simultanée de hyaluronidase et d'acide hyaluronique dans le même milieu biologique ne semble donc pas se poser.

(Institut Pasteur. Service de Chimie Microbienne et Service des Virus.)

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DES BACTÉRIES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

I. — TECHNIQUE DE MISE EN ÉVIDENCE PAR DIGESTION ENZYMATIQUE DE L'APPAREIL NUCLÉAIRE

par Y. T. TCHAN et J. GIUNTINI.

L'existence d'un appareil nucléaire chez les bactéries est admise aujourd'hui par beaucoup d'auteurs et des études biochimiques de cet appareil ont été faites qui permettent de le considérer comme de nature désoxyribonucléique (1). Malgré les perfectionnements techniques apportés aux colorations et aux digestions (2), l'étude cytologique de cette question se trouve limitée par le pouvoir séparateur des micro-

(5) F. DURAN-REYNALS, *Bact. Rev.*, 1942, 6, 198.

(1) A. BOIVIN, R. VENDRELY et R. TULASNE, *Arch. Sci. physiol.*, 1948, 1, 35 ; *id.*, *ibid.*, 1948, 1, 307.

(2) K. A. BISSET, *J. gen. Microb.*, 1948, 2, 126. — P. BOQUET et Y. LEHOULT, *ces Annales*, 1948, 74, 339. — L. QUERSIN, *ces Annales*, 1948, 75, 522. — M. PRÉCHAUX, *ces Annales*, 1948, 75, 66. — J. SMITH, F. V. WELCH et W. J. ELFORD, *J. gen. Microb.*, 1948, 2, 220.

scopes ordinaires. En effet, si on admet la limite de résolution d'un microscope dans de bonnes conditions de contraste en lumière visible à $0,25 \mu$ (objectif bien corrigé, O.N.=1.4), l'appareil nucléaire qui a une grandeur assez près de cette limite ne peut être étudié avec précision. Nous avons donc pensé qu'il était logique pour faire de nouvelles investigations dans de bonnes conditions de nous adresser au microscope électronique qui lui, est limité par un pouvoir de résolution très petit (2 m μ) mais qui, par contre, présente d'autres difficultés ; ces dernières sont dues, d'une part, au contraste insuffisant (2 bis) et, d'autre part, aux techniques spéciales des préparations, qui font perdre une partie importante du gain que l'on aurait pu espérer.

Knaysi et Mudd [1943] (3) ont tenté de résoudre ce problème par examen au microscope électronique de préparations traitées au bicarbonate de sodium. Les résultats publiés par ces auteurs sur les staphylocoques ne semblent pas confirmer les images obtenues par les méthodes de Robinow ou celles de Vendrely et Tulasne (1). En effet, les granulations n'ont pas le même aspect que ce qu'on a l'habitude de voir au microscope ordinaire. D'ailleurs on n'a pas pu confirmer les observations de Knaysi avec les gonocoques, les streptocoques et les staphylocoques.

D'autre part, Knaysi et Mudd (4) pensent que chez les cellules jeunes les granulations nucléaires se trouvent à l'état dissous dans le cytoplasme. Ils appuient leur théorie sur l'augmentation d'opacité du cytoplasme chez les cellules jeunes, cette opacité plus forte étant due à une teneur en acides nucléiques plus élevée. Knaysi (5) a aussi examiné la germination des spores de *B. mycoides* en milieu pauvre sans phosphore, ni azote. Les spores dans ces conditions ne peuvent germer qu'en épuisant les réserves contenues dans la cellule dont le cytoplasme apparaît transparent aux électrons ; l'auteur a ainsi obtenu des cellules Gram négatives avec un appareil nucléaire plus opaque que le cytoplasme au microscope électronique.

Robinow et Cosslett (6), au contraire, ont montré que l'appareil nucléaire des bactéries est moins opaque que le cytoplasme aux électrons. Hillier, Mudd et Smith (7) confirment cette observation. Il nous semble donc que cette différence n'est pas due à une erreur d'interprétation, mais à une répartition inégale de l'acide nucléique dans la cellule.

Si l'observation au microscope électronique de l'appareil nucléaire est gênée par les acides nucléiques, il est logique alors d'utiliser des techniques pour enlever l'un des deux acides afin de rendre l'autre visible.

La technique de Knaysi, quoique très élégante, ne nous satisfait pas entièrement. En effet, la culture obtenue sur un milieu sans phosphore, ni azote ne peut pas être considérée comme une culture normale. Les cellules sont indiscutablement souffrantes et la morphologie de leurs

(2 bis) J. HILLIER, *J. Bact.*, 1949, **57**, 313.

(3) G. KNAYSI et S. MUDD, *J. Bact.*, 1943, **45**, 349.

(4) G. KNAYSI, *Bact. Rev.*, 1948, **12**, 19.

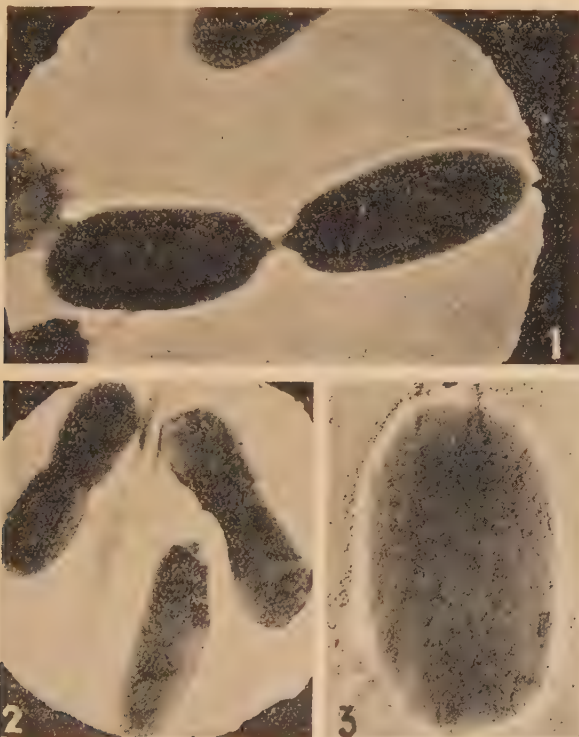
(5) G. KNAYSI, *J. Bact.*, 1948, **55**, 753.

(6) ROBINOW et COSSLETT, *J. applied Phys.*, 1948, **19**, 124.

(7) J. HILLIER, S. MUDD et A. G. SMITH, *J. Bact.*, 1949, **57**, 319.

noyaux dans ces conditions ne peut présenter de garantie suffisante pour la considérer comme normale.

La technique de Robinow par la digestion chlorhydrique présente, par contre, des inconvénients ; un traitement par une solution d'acide chlorhydrique normal à 60° C détruit facilement la membrane de collodion qui sert de support aux objets destinés à être examinés au microscope électronique. Nous nous sommes donc adressés à une diges-



1, *P. pestis* non digéré ; gross. : 25 000 ; 2, *P. pestis* insuffisamment digéré ; gross. : 18 000 ; 3, *P. pestis* bien digéré ; gross. : 30 000. La tension d'accélération des électrons est 80 kv. pour toutes les images.

tion enzymatique à ribonucléase à 37°, qui est très intéressante car elle offre des garanties de spécificité et, en outre, respecte la membrane de collodion qui résiste assez bien à un traitement enzymatique (8).

En pratique, la technique présente quelques difficultés. Hillier, Mudd et Smith montrent que la visibilité des structures internes des cellules au microscope électronique ne dépend que de la transparence relative

(8) I. M. DARDSON et A. D. MCFARLANE, *Nature*, 1948, **161**, 464. — P. LÉPINE, P. ATANASIU et O. CROISSANT, *C. R. Acad., Sci.*, 1949, **228**, 1068.

des diverses parties de la cellule. Cette transparence, dépendant avant tout du contraste obtenu par l'objectif, est réglée par la diffraction des électrons sur la portion considérée (la diffraction est proportionnelle à l'épaisseur et à la densité). Une préparation digérée pouvant être parfaite à l'examen au microscope ordinaire reste absolument homogène sans aucune structure interne au microscope électronique. Il nous a donc fallu diminuer une quantité importante d'acide ribonucléique pour que les électrons puissent révéler la structure des appareils nucléaires, et réaliser un titrage de digestion pour obtenir des préparations convenables. Le résultat dépend principalement de la spécificité de l'agent qu'on utilise pour effectuer cette digestion. La technique opératoire était la suivante :

Une culture en pleine croissance (phase logarithmique) est mise en suspension dans de l'eau physiologique : déposer des gouttes de cette suspension sur des lames de verre en même temps que sur les porte-objets électroniques ; laisser reposer une minute, puis retirer l'excès d'eau. Les préparations ainsi obtenues ne tardent pas à sécher ; les fixer par le fixateur Chabaud pendant une heure. Les laver à l'eau distillée pendant trente minutes.

On fait alors un premier titrage sur les préparations faites sur lames pour obtenir le temps de digestion et la concentration d'enzymes convenable.

En nous basant sur ce premier titrage, nous effectuons la digestion des préparations pour le microscope électronique. En général, il suffit de prolonger de cinq à dix minutes le temps de digestion déterminé antérieurement pour obtenir des préparations utilisables en procédant par un véritable titrage sur les préparations digérées de cinq en cinq minutes et choisies après examen au microscope ordinaire.

Une fois la digestion terminée, laver les préparations à l'eau distillée pendant une heure et les sécher.

Ces préparations sont alors examinées soit directement au microscope électronique, soit après un ombrage à l'or effectué par une évaporation d'or sous vide sous un certain angle.

Les images 1, 2, 3, à divers stades de la digestion, illustrent bien les résultats obtenus par notre technique.

(Institut Pasteur.)

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DES BACTÉRIES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

II. — ÉTUDE DE L'APPAREIL NUCLÉAIRE DE QUELQUES BACTÉRIES PATHOGÈNES

par J. GIUNTINI et Y. T. TCHAN.

Nous avons montré antérieurement (1) que la digestion enzymatique peut permettre au microscope électronique d'explorer la cytologie des bactéries. En utilisant la même technique, nous allons examiner quel-

(1) Y. T. TCHAN et J. GIUNTINI, ces *Annales*, 1949, 77, 185.

ques microbes pathogènes se répartissant en cocci et en bâtonnets Gram positifs et Gram négatifs.

I. *Pasteurella pestis* (fig. 1, images 8-9-10). — Les cellules jeunes de ces germes sont presque complètement opaques aux électrons (accélération 80 Kv). Une fois digérées, la structure interne des cellules devient

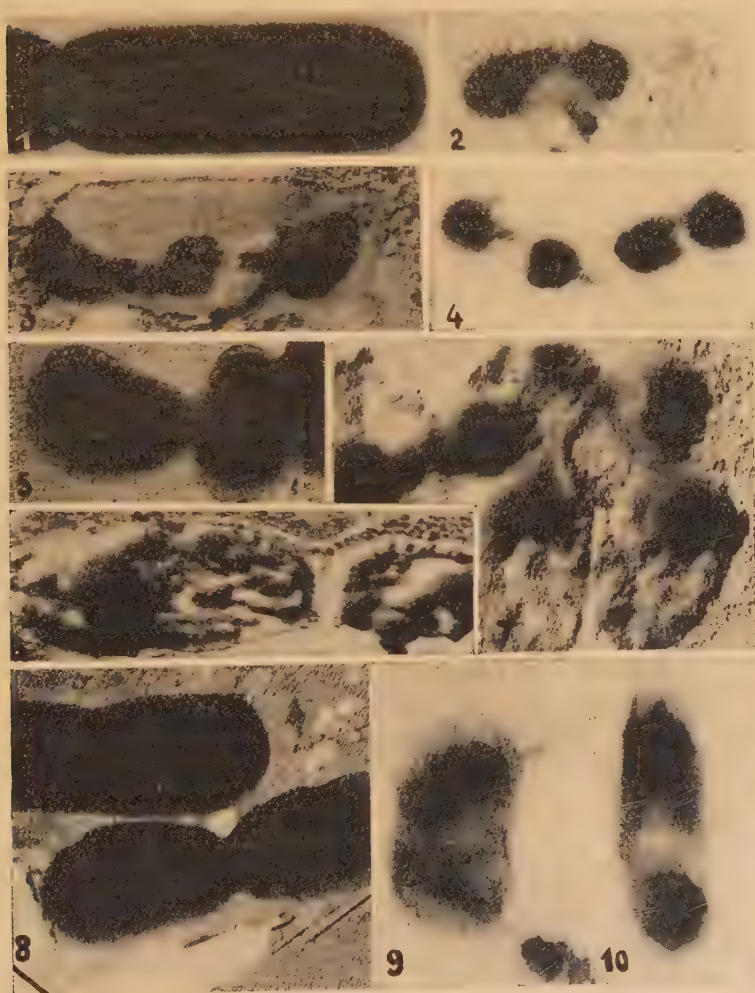


FIG. 1. — 1, *B. coli* non digéré; gross. : 28.000; tension 80 kv.; 2, 3, 4, *B. coli* digérés montrant leur appareil nucléaire; 2. gross. : 22.000; 3, gross. : 30.000; 4, gross. : 20.000; 5, *V. cholera* non digérés; gross. : 30.000; 6, 7, *V. cholera* digérés montrant leur appareil nucléaire; gross. : 27.000; 8, *P. pestis* non digérés; gross. : 30.000; 9, 10, *P. pestis* digérés montrant leur appareil nucléaire; gross. : 30.000. La tension d'accélération des électrons est 80 kv. pour toutes les images.

visible. On voit deux masses nucléaires, soit à chaque extrémité de la cellule, soit vers le centre. La position des masses nucléaires confirme les observations antérieures faites par nous au microscope ordinaire (2). De plus, on voit nettement que la structure des masses nucléaires est hétérogène, l'interprétation de cette hétérogénéité restant encore très difficile. Peut-on l'envisager comme une localisation de gènes ? Pour nous, cette question ne peut encore être résolue actuellement. Cependant, il est permis de dire que les masses nucléaires sont composées de plusieurs régions plus ou moins riches en nucléoprotéines. Chaque portion, par sa teneur différente en acide nucléique, pourrait répondre à une ou plusieurs fonctions biochimiques différentes.

Au cours de la division cellulaire, on peut apercevoir des restes de nucléoprotéine entre les masses nucléaires.

II. *Bacterium coli* (fig. 1, images 1-2-3-4). — Le récent travail de Hillier, Mudd et Smith (3) sur le *B. coli* effectué avec un microscope électronique modifié (objectif à très fort contraste) semble montrer l'existence de noyaux chez les jeunes cellules. Les préparations de ces auteurs n'ont pas subi de digestion et les images, peu nettes, sont difficiles à interpréter. Par contre, les images que nous avons observées correspondent bien à celles obtenues en lumière visible. Nous avons pu mettre nettement en évidence les appareils nucléaires ; leur structure, de même que celle de *P. pestis*, est hétérogène.

III. *Vibrio cholerae* (fig. 1, images 5-6-7). — Le vibrion cholérique jeune est suffisamment perméable aux électrons et présente une structure en microscopie électronique sans digestion. Cependant, les images obtenues après la digestion nous permettent de mieux situer l'emplacement des désoxyribonucléoprotéines. Ces images semblent indiquer que les cellules contiennent une masse nucléaire importante. Cependant, dans le cytoplasme, il reste de petites parties non digérées par la ribonucléase.

IV. *Streptococcus mastitidis* (fig. 2, images 14-15-16-17). — Avec le streptocoque nous abordons les germes Gram positifs. Tulasne et Vendrely (4) ont montré que les cocci contiennent un seul grain chromatique. Celui-ci se divise en 2 grains réniformes qui se séparent en donnant deux cellules filles. L'examen électronique confirme bien ces observations tout en apportant des détails intéressants.

D'abord, les deux grains chromatiques ne sont pas exactement réniformes. Ce sont deux demi-sphères à bords arrondis, symétriques par rapport au plan de séparation et qui, selon l'orientation de chaque cellule, peuvent se voir avec des tailles légèrement différentes.

D'autre part, après la fin de la division, les deux cellules filles semblent collées par leur appareil nucléaire d'une façon plus ou moins lâche, ce qui expliquerait l'accolement en chaînettes de ces germes.

Toutes proportions gardées, le microscope électronique montre l'appareil nucléaire des streptocoques plus grand que celui qui a été décrit par la microscopie ordinaire. Cet appareil semble hétérogène, mais d'une manière moins marquée que pour les autres bactéries.

V. *Bacillus anthracis* (fig. 2, images 11-12-13). — L'appareil nucléaire

(2) W. P. WEI, Y. T. TCHAN et J. POCHON, ces Annales, 1948, 75, 87.

(3) J. HILLIER, S. MUDD et A. G. SMITH, *J. Bact.*, 1949, 57, 319.

(4) R. TULASNE et R. VENDRELY, *Nature*, 1948, 161, 316.

du *B. anthracis* a été étudié par Flewet (5) en lumière visible. La souche que nous avons examinée donne des images de cellules avec une membrane assez nette. Il nous semble que cette membrane pourrait correspondre à un rudiment de capsule, qui est, bien entendu, invisible au

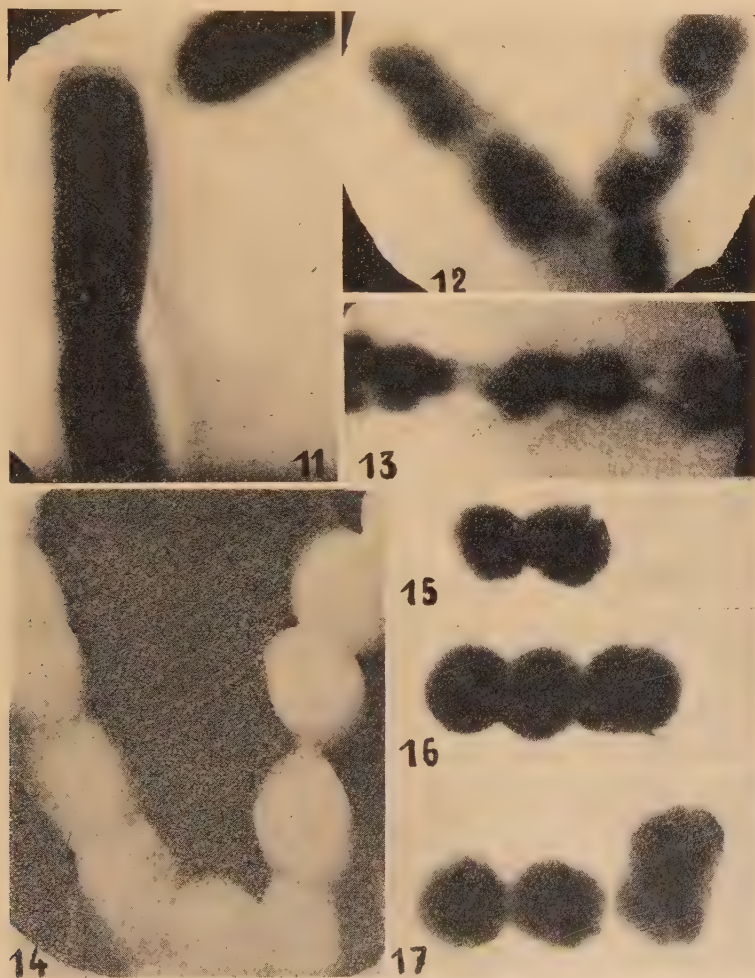


FIG. 2. — 11, *B. anthracis* non digérés avec capsule ; gross. : 23.000 ; 12, 13, *B. anthracis* digérés montrant leur appareil nucléaire ; gross. : 20.000 ; 14, *Strept. mastitidis* non digérés ; gross. : 28.000 ; 15, 16, 17, *Strept. mastitidis* digérés montrant leur appareil nucléaire ; gross. : 28.000. Le n° 16 montre un reste de cytoplasme indiquant la limite des cellules. La tension d'accélération des électrons est de 80 kv. pour toutes les images.

(5) T. H. FLEWETT, *J. gen. Microb.*, 1948, 2, 325.

microscope ordinaire. Une fois digérée, la cellule de *B. anthracis* montre un appareil nucléaire.

DISCUSSION. — Il nous semble que le présent travail apporte une certaine précision sur l'appareil nucléaire des bactéries. Les travaux de Knaysi et Mudd (6) tendraient à montrer que les appareils nucléaires des bactéries sont beaucoup plus petits et totalement différents de ceux décrits par les techniques de Robinow ou de Boivin. Cependant, il est indiscutable que les corpuscules observés par Knaysi et Mudd sont de nature désoxyribonucléique et il faudrait peut-être les considérer comme une partie de l'appareil nucléaire des bactéries. Le *P. pestis* possède en réalité des grains nucléiques beaucoup plus volumineux que ceux décrits par Knaysi et Mudd ; pour les streptocoques, les corpuscules de Knaysi et Mudd correspondent probablement à des parties particulièrement denses de l'appareil nucléaire qui serait formé en réalité par des demi-sphères ou des sphères.

L'hypothèse d'une diffusion des grains nucléiques au cours de la division ne nous semble pas soutenable. En effet, l'étude cytologique des bactéries par la microscopie ordinaire, après digestion enzymatique ou après hydrolyse par l'acide chlorhydrique dilué, a toujours mis en évidence la présence d'un appareil nucléaire et nos expériences sur les bactéries en pleine croissance, après une digestion spécifique, confirment pleinement ces résultats. Pour expliquer le désaccord avec l'hypothèse précédente, il faudrait s'appuyer sur les observations de Malmgren et Heden (7) qui ont constaté que les bactéries en pleine croissance (phase logar.) contiennent beaucoup plus de nucléoprotéines que les bactéries au repos, l'excès de l'un masquant l'image de l'autre. Ce fait est particulièrement significatif lorsqu'on tient compte que, dans le cas particulier du *P. pestis*, une culture même âgée de dix-huit heures a déjà deux tiers de cellules non repiquables (8). Nous pensons donc que cette raison explique peut-être les variations de structure observées par Knaysi et Mudd sur le *P. pestis* avec des cultures d'âges différents.

Enfin, il faut admettre que la digestion spécifique de ribonucléotides ne permet, bien entendu, pas d'enlever les autres constituants de la cellule qui peuvent aussi être des causes d'hétérogénéité de l'appareil nucléaire des bactéries. Cette dernière question nous semble actuellement très difficile à résoudre. Néanmoins, nous pensons que l'étude systématique des bactéries en microscopie électronique fera progresser nos connaissances sur la cytologie des bactéries trop souvent limitées par le pouvoir séparateur des instruments optiques courants.

(Institut Pasteur.)

(6) G. KNAYSI et S. MUDD, *J. Bact.*, 1943, 45, 349.

(7) MALMGREN et HEDEN, *Act. Microbiol. Path. Scand.*, 1947.

(8) Y. T. TCHAN, *Bull. Soc. Path. exot.*, 1949, 42, 89.

ETUDE QUANTITATIVE DE L'HÉMOLYSE PAR LES ACIDES GRAS

(PREMIÈRE NOTE)

par D. G. DERVICHIAN.

L'action hémolytique de l'acide laurique (P. F. 43,5°) sur les hématies de l'homme, du cheval et de la chèvre a été étudiée à différents pH allant de 5,8 à 8,5, surtout en ce qui concerne la vitesse de l'hémolyse. Si la neutralisation complète de l'acide gras ne se produit (suivant la concentration) qu'à des pH supérieurs à 9, il subsiste toutefois une neutralisation partielle et surtout une ionisation plus ou moins grande se manifestant encore dans le domaine de pH que nous avons étudié. Pour procurer les cations nécessaires à cette neutralisation partielle, il est commode de partir du sel alcalin de l'acide laurique (1, 2). Après neutralisation par KOH dans les solutions mères de départ, le sel de l'acide laurique est amené par addition de HCl au pH désiré avant de le répartir à différentes concentrations. Suivant le pH et la concentration, on a affaire à des solutions ou des suspensions de l'acide laurique à l'état de sel plus ou moins acide.

Les dilutions ont été faites en présence de tampon phosphate à la concentration de M/100 (soit inférieure à 4 g. pour 1.000). L'isotonicité de la solution est obtenue en ajoutant 8 p. 1.000 de KCl. La nature du cation associé à l'acide gras ayant une importance sur son domaine de température d'utilisation, dans toutes les expériences ici décrites seul l'ion K a été utilisé à l'exclusion de l'ion Na. Les différents lavages successifs des globules étaient donc opérés en présence de la solution isotonique, suivis de deux lavages dans la solution tampon au pH où devait se faire l'étude.

Toute une échelle de concentrations différentes de l'acide laurique est répartie entre une quinzaine de tubes à hémolyse. La purée globulaire était diluée environ une fois et demie et la numération des globules rouges effectuée ensuite.

Trois séries d'expériences ont toujours été préparées pour chaque pH (en plus du témoin ne contenant pas d'acide laurique). Une première série se rapportait à 0,05 cm³ de la suspension d'hématies ajoutée dans 3 cm³ de la solution ou de la suspension d'acide laurique à la concentration et au pH étudié. Dans la deuxième série, 0,5 cm³ de la même suspension d'hématies étaient ajoutés à 2 cm³ de la solution d'acide laurique et le volume ramené à 3 cm³ par addition de 0,5 cm³ de solution tampon. Enfin, dans la troisième série, les proportions étaient de 1 cm³ de suspension d'hématies ajouté à 2 cm³ de solution d'acide laurique. Tous ces liquides sont mélangés après établissement de leur équilibre dans une chambre à 23° et toutes les observations après

(1) DERVICHIAN et KÉPÈS, *Bull. Soc. Chimique de France*, sous presse.

(2) DERVICHIAN, J. GUILARD et H. ROSANO, *Bull. Soc. Chimique de France*, sous presse.

mélange effectuées dans la même chambre. Les tubes étaient fréquemment agités pour supprimer l'effet de la sédimentation et assurer une bonne homogénéisation.

Le travail ici décrit a porté plus particulièrement sur les vitesses de la lyse en fonction de la concentration. Il s'agit plus exactement de la détermination du temps nécessaire pour l'obtention de la lyse complète. La fin de ce phénomène pouvait être observée avec une précision relativement grande : à quelques secondes près sur des durées de quelques minutes, à quelques minutes près sur des durées de plusieurs heures. Le tableau I, relatif aux observations faites à pH 7,4 avec 0,05 cm³ d'hématies de cheval, donne une idée de l'allure du phénomène. Les concentrations d'acide laurique sont exprimées en molarités.

TABLEAU I.

ACIDE LAURIQUE	TEMPS	ACIDE LAURIQUE	TEMPS
3,33 10 ⁻³ M . . .	2 min. 25.	4,48 10 ⁻³ M . . .	25 minutes.
2,85	3 min. 50.	1,0	87 minutes.
2,50	5 min. 20.	0,83	157 minutes.
2,0	9 min. 50.	0,66	327 minutes.
1,67	9 min. 35.	0,50	Lyse partielle en 8 heures.
1,54	15 min. 25.		
1,33	14 min.	0,33	Pas de lyse en 20 heures.

On constate que le phénomène, assez rapide jusqu'à une certaine dilution, change d'allure aussitôt après en subissant un ralentissement assez brusque. Ainsi, alors qu'à 1,18. 10⁻³ M la fin de l'hémolyse est observée au bout de vingt-cinq minutes, elle ne se produit plus qu'au bout de quatre-vingt-sept minutes pour 1,0 10⁻³ M et pour des durées encore plus longues aux plus grandes dilutions.

Ainsi peut se définir une certaine concentration caractéristique au-dessus de laquelle le temps de lyse complète varie à peu près proportionnellement à la concentration en acide laurique, ne dépassant pas une vingtaine de minutes avec 0,05 cm³ de suspension d'hématies.

On observe également, surtout en traçant la courbe représentative, l'existence d'une limite de concentration en acide laurique au-dessous de laquelle il ne se produit plus de lyse au bout d'une douzaine d'heures (l'observation a porté parfois sur vingt-quatre heures). En envisageant les deux domaines de concentrations allant respectivement de cette concentration limite très faible à la concentration caractéristique de changement d'allure et de celle-ci aux plus fortes concentrations en acide laurique, on est donc conduit à définir deux régimes de vitesses dans l'hémolyse.

Une première conclusion se dégage déjà. Il apparaît difficile de définir le pouvoir hémolytique d'une substance en effectuant des observations au bout d'un temps arbitraire sans avoir, au préalable, établi une courbe des variations des vitesses en fonction des concentrations. En effet, pour différentes substances, l'activité hémolytique, définie par l'observation au bout d'un temps fixe, pourrait porter sur l'un ou

l'autre domaine de régimes différents. La figure 1 reproduit les courbes représentant la durée de la lyse en fonction de la concentration en acide laurique pour différents pH. Toutes ces courbes sont relatives à 0,05 cm³ d'hématies dispersés dans 3 cm³ de la solution. D'une façon générale, la fin de la lyse se produit pour des concentrations d'acide

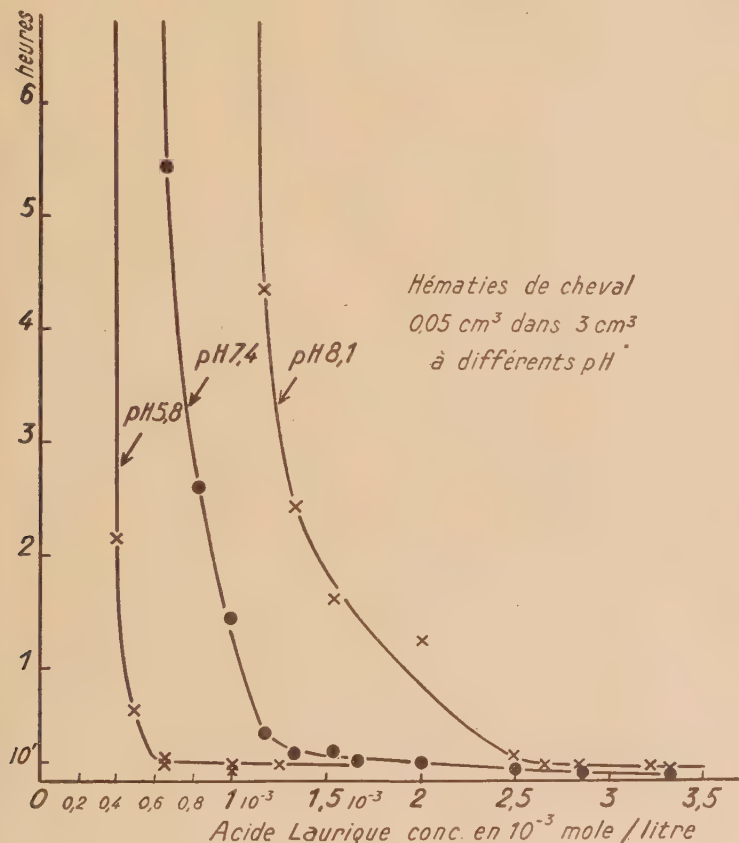


FIG. 1.

laurique d'autant plus faibles que le pH est plus bas. Les observations faites par Cavier (3) au bout d'une heure de contact correspondent donc à l'intersection de l'ensemble de ces courbes par la droite horizontale passant par l'ordonnée d'une heure. On voit que les concentrations ainsi définies se rapportent au régime lent de l'hémolyse. On pourrait dire avec Cavier que l'activité (dans le sens pharmacologique) est plus grande à pH bas qu'à pH élevé. L'interprétation de ces faits sera

(3) R. CAVIER, Bull. Soc. Chim. biol., 1397, 49, 1663.

donnée dans une autre communication. Des courbes semblables ont été tracées pour des pH fixes, mais pour différentes concentrations en globules rouges (dix fois plus et vingt fois plus). La figure 2 est relative aux hématies de la chèvre lysées à pH 8,1 en employant 0,05 cm³ de suspension de globules, 0,5 et 1 cm³. La concentration en acide laurique est définie par rapport au volume total. Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, on voit tout de suite que la lyse nécessite d'autant plus d'acide laurique qu'il y a plus de globules à lyser. Mais deux conclusions importantes se dégagent d'une étude plus fine des faits.

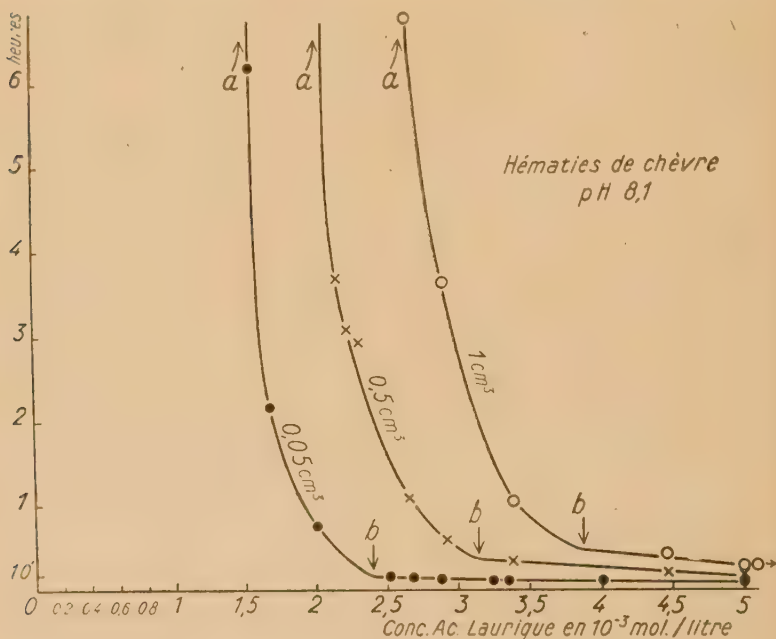


FIG. 2.

Si l'on porte sur un graphique les concentrations limites en acide laurique pouvant encore produire la lyse (au bout d'un temps très long) en fonction de la quantité de globules, on voit que ces quantités se placent sur une droite (figure 3, courbe a) coupant l'ordonnée à l'origine en un point indiquant le seuil de la concentration nécessaire pour produire la lyse d'un nombre de globules négligeable par rapport au volume de la solution. Autrement dit, dans l'exemple particulier de la figure 2, il ressort de la courbe a de la figure 3 qu'il faut au moins une concentration de $1,3 \cdot 10^{-3}$ M pour qu'un effet soit observé. De plus, une quantité supplémentaire d'acide laurique, d'autant plus importante qu'il y a davantage de globules rouges, est exigée, en plus de cette quantité seuil, comme si chaque nouvelle hématie présente dans la solution immobilisait une certaine quantité

d'acide laurique. Cette quantité supplémentaire par centimètre cube de suspension d'hématies introduite dans la solution est donc fournie par la différence h entre les ordonnées du point O et celles du point 1 cm^3 de la figure 3. La droite b de la figure 3 représente de la même façon la variation, en fonction du nombre d'hématies, de la concentration b caractéristique du changement d'allure de vitesse d'hémolyse.

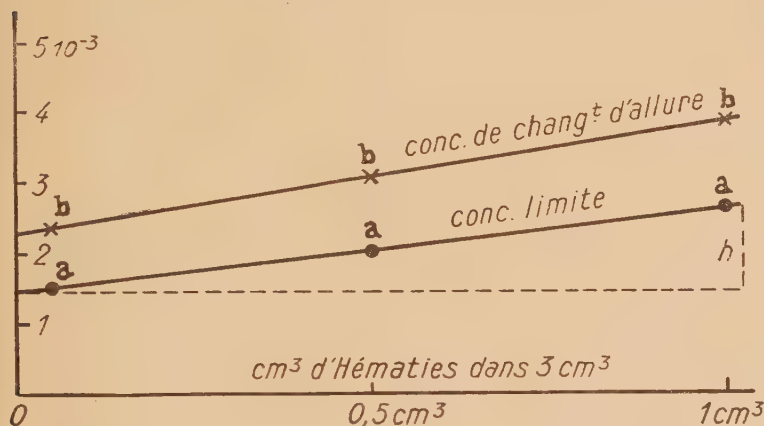


FIG. 3.

Le tableau II donne les valeurs des seuils de concentrations mesurées pour différents pH et différentes espèces d'hématies.

TABLEAU II.

	CHEVAL	CHÈVRE	HOMME
pH 5,8	0,3 10^{-3} M		
pH 6,9	0,5	0,4 10^{-3} M	
pH 7,4	0,6		
pH 8,1	1,1	1,3 10^{-3} M	0,9 10^{-3} M
pH 8,5	1,0		

En ce qui concerne l'acide laurique fixé, on peut, connaissant le nombre d'hématies par centimètre cube, calculer la quantité fixée par hématie. Ce calcul effectué pour les valeurs limites et pour pH 8,1 donne les grandeurs suivantes :

Homme	9,5 10^{-16}	molécule-grammes par hématie.
Cheval	6 10^{-16}	—
Chèvre	4,5 10^{-16}	—

Mais ces quantités fixées varient avec le pH. Ainsi, pour le cheval, la quantité fixée à 7,4 est de une fois et demie plus importante et, à pH 5,8, trois fois plus importante que la quantité fixée à pH 8,1.

Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, la durée de l'hémolyse pour une concentration donnée varie avec la température.

Voici les durées nécessaires à la lyse complète observées avec 0,05 cm³ d'hématies de cheval pour deux concentrations différentes en acide laurique et à 3 températures différentes.

Températures.	35°	23°	4°
Durée pour 0,83 10 ⁻³ M.	1 minute.	5 minutes.	120 minutes.
Durée pour 0,65 10 ⁻³ M.	7 minutes.	50 minutes.	280 minutes.

Une étude plus détaillée de l'action de la température sera décrite dans un autre mémoire.

Je tiens à remercier M^{lle} O. Schurr, du laboratoire de l'Hôpital Pasteur, pour le soin qu'elle a apporté dans la numération des hématies. Je remercie également M^{lle} J. Guillard pour l'aide qu'elle m'a apportée dans ce travail.

(Institut Pasteur, Service de Chimie Physique.)

UNE NOUVELLE ESPÈCE DE *SALMONELLA* : *SALMONELLA TANANARIVE*

par L. et S. LE MINOR et R. NEEL.

En décembre 1948, l'un de nous a isolé à Tananarive (Madagascar), chez un porc apparemment sain et devant être livré à la consommation, un bacille Gram négatif, mobile, présentant les caractères biochimiques des *Salmonella* (souche P 14). La technique d'isolement fut la suivante : Broyage dans un mortier avec un peu de sable d'un ganglion mésentérique légèrement hémorragique. Ensemencement de la totalité du broyat dans 15 cm³ de milieu d'enrichissement de Müller-Kauffmann. Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, isolement sur plaque de Kristensen-Kauffmann et gélose lactosée au bleu de bromothymol. Sur les deux plaques, présence de colonies lactose-négatives.

Caractères biochimiques :

Glycérol (Stern)	+
Xylose	+
Arabinose	+
Glucose	+
Mannite	+
Dulcite	+
Lactose	0
Saccharose	0
Maltose	+
d Tartrate de sodium	+
Citrate de sodium	+
H ₂ S	+
Indol	+
Gélatine	Non liquéfiée.
Rouge neutre	Réduit.

Cette souche donne des gaz dans les milieux additionnés des oses qu'elle fermente.

Caractères sérologiques. — Agglutination dans les sérums VI.VII, VI.VIII, VIII, γ et 1,2-1,5-1,6 et 1,7 et 5 saturé. Aucune agglutination dans les sérums VII et 2 saturés. Aucune *Salmonella* actuellement décrite ne correspondant à cette formule sérologique, nous avons injecté un lapin avec cette souche vivante par voie intraveineuse (culture de dix-huit heures sur gélose). Les doses étaient 1 milliard, 2 milliards et 4 milliards, à quatre jours d'intervalle. L'animal fut saigné à blanc dix jours après la dernière injection.

Titration en tubes vis-à-vis des suspensions O de :

P ₁₄	1/800
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 1350 (VI ₁ , VII)	1/1.600
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 5210 (VI ₂ , VII)	1/400
<i>S. paratyphi</i> C (VI ₁ , VI ₂ , VII)	1/400
<i>S. newport</i> 563 (VI ₁ , VIII)	1/800
<i>S. typhi</i> (IX, XII, Vi)	0

Titration vis-à-vis des suspensions H de :

P ₁₄	1/51.200
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 1350 (1,5)	1/38.400
<i>S. cholerae suis</i> 5210 (1,5)	1/51.200
<i>S. paratyphi</i> B non spéc. (1,2)	1/6.400
<i>S. anatum</i> non spéc. (1,6)	1/12.800
<i>S. gaminara</i> non spéc. (1,7)	1/200
<i>S. bareilly</i> non spéc. (1,5)	1/6.400

I. *Détermination des agglutinogènes O.* — Nous avons saturé par étapes 30 cm³ de sérum du lapin, dilué au 1/10.

1° Saturation avec *S. cholerae suis* 1350 (VI₁, VII). Culture de vingt-quatre heures lavée, centrifugée et chauffée deux heures trente minutes à 100°. Sur le culot microbien, on rajoute le sérum et on remet les germes en suspension homogène ; après un séjour de deux heures à 37°, le pot à centrifuger est laissé à la glacière jusqu'au lendemain. Après centrifugation, le sérum est éprouvé. Il nous a fallu la culture de 13 boîtes de Roux pour saturer ce sérum vis-à-vis de *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* 1350.

Après cette opération, le titrage en tubes vis-à-vis des suspensions O nous a donné :

<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 1350	0
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 5210	0
<i>S. paratyphi</i> C	0
<i>S. newport</i> 563	1/800
<i>S. newport</i> var. <i>puerto rico</i>	1/800
P ₁₄	1/400

La souche possède donc l'agglutinogène VI₁ et ne possède pas de VI₂.

2° Saturation par la culture chauffée deux heures trente minutes à 100° de la souche Newport (4 boîtes de Roux). Agglutination en tubes vis-à-vis des suspensions O de :

<i>S. newport</i> 563	0
<i>S. newport</i> var. <i>puerto rico</i>	0
P ₁₄	0

La formule O est donc VI₁, VIII.

II. Détermination des agglutinogènes H. — 1° Saturation de la phase non spécifique :

Le sérum dont les agglutinines O sont saturées donne sur lame les agglutinations suivantes vis-à-vis des souches vivantes de :

<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 1350.	+
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 5210	+
<i>S. paratyphi</i> B non spéc.	+
<i>S. anatum</i>	+
<i>S. gaminara</i>	+
<i>S. bareilly</i>	+
<i>S. newport</i> 563.	+
P ₁₄	+

On sature avec la culture vivante de *S. cholerae suis* var. *kunzendorf* 1350 (récolte de 17 boîtes de Roux, lavée et centrifugée).

Une fois le sérum saturé (ici comme pour saturer l'agglutinogène VI₁, il nous a fallu recommencer plusieurs fois avant d'arriver à la saturation complète avec le nombre total de boîtes de Roux que nous avons indiqué), les agglutinations sur lames étaient les suivantes :

<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 1250.	0
<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kunzendorf</i> 5210.	0
<i>S. gaminara</i>	0
<i>S. anatum</i>	0
<i>S. newport</i> 563	0
<i>S. paratyphi</i> C	0
P ₁₄	+
<i>S. tel aviv</i>	+
<i>S. carrau</i>	+

La phase 2 est donc 1,5.

2° Saturation des agglutinogènes de la phase 1 :

Le sérum est additionné de la culture vivante de *S. tel aviv* (4 boîtes de Roux).

Il est alors complètement saturé, comme le prouvent les agglutinations sur lames et en tubes :

<i>S. tel aviv</i>	0
<i>S. carrau</i>	0
<i>S. bareilly</i>	0
P ₁₄	0

La phase 1 est donc y.

La formule de cette *Salmonella* est donc VI₁, VIII, y, 1,5.

Pouvoir pathogène pour la souris : Pas d'action létale à la dose de 100 millions injectés par voie intrapéritonéale.

Résumé. — A partir d'un ganglion mésentérique de porc, nous avons isolé une nouvelle espèce de *Salmonella* du groupe C.

Sa formule antigénique est VI₁, VIII, y \longleftrightarrow 1,5.

(Institut Pasteur de Paris, Service des Vaccins
et Institut Pasteur de Tananarive.)

ÉTUDE DU SÉRUM DE CHEVAL HÉMOLYTIQUE ANTI-MOUTON ET SÉPARATION DES DEUX FONCTIONS ANTI-ENDOTOXIQUES

par G. SANDOR.

Nous avons montré antérieurement la relation curieuse qui existe dans le cas du sérum de cheval entre la solubilité des divers fractions globuliniques et la nature de l'activité immunologique que, le plus souvent, elles supportent (1). Cette relation, d'ailleurs, est hautement rationnelle puisque les agglutinines, dont le rôle insolubilisant est patent, accompagnent la globuline la moins soluble (euglobuline I), tandis que les antitoxines sont des pseudoglobulines très solubles. Or, ce ne sont que des « antidotes ». Entre les deux se situent les ambocepteurs qui sont en partie des euglobulines de solubilité intermédiaire (euglobuline II A) et en partie des γ -pseudoglobulines de caractères physiques probablement très proches.

Les hémolysines aussi ont un pouvoir agglutinant, mais ce pouvoir est variable suivant les préparations et les sérums. Dès lors, il était intéressant d'examiner comment les deux activités, amboceptrice et agglutinante, se répartissaient parmi les diverses fractions euglobuliniques du sérum hémolytique antimouton de cheval.

Le fractionnement est conduit comme suit : Le sérum est dialysé contre une solution de tampon phosphate de Soerensen M/75 de pH 7,6 pendant quelques heures, puis, pendant quarante-huit heures, contre le même tampon M/150. Le précipité est recueilli, lavé deux fois avec le dialysat, dissous dans l'eau physiologique bicarbonatée à 1 p. 1.000 et remis à dialyser contre l'eau distillée pendant vingt-quatre heures. Enfin, il est dissous dans l'eau physiologique bicarbonatée (euglobuline I). Les eaux-mères sont diluées dans l'eau distillée au 1/4. En général, il apparaît un deuxième précipité abondant qui est traité comme le premier (euglobuline I A). Les eaux-mères finales sont amenées successivement à pH 6,2 en éliminant au fur et à mesure les précipités formés. Ces derniers sont réunis et traités comme les deux premières fractions (euglobuline II A).

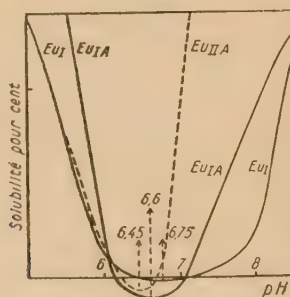
Nous avons, en fait, séparé arbitrairement en trois une famille de substances de caractères physico-chimiques très proches au sein de laquelle la solubilité augmente continuellement en même temps que le point isoélectrique se déplace progressivement vers des pH de plus en plus faibles. Dans la figure ci-après nous avons réuni les courbes de solubilité en fonction du pH de nos trois fractions (fig. 1).

Pour obtenir ces courbes, les fractions lavées et remises à dialyser contre l'eau distillée sont dissoutes dans ce solvant à l'aide de l'acide chlorhydrique N/20 en quantité juste suffisante de façon à avoir une

(1) G. SANDOR, *C. R. Ac. Sci.*, 1948, 227, 378.

solution de protéides de 3 p. 100 environ. On prélève des quantités aliquotes, on ajoute des volumes variables de soude N/20 et on complète au même volume final partout. Les mélanges sont agités énergiquement et centrifugés au bout de dix minutes. Sur les eaux-mères on détermine les pH et les teneurs en protéides. Etant donné que nous opérons en l'absence d'électrolytes, le minimum de solubilité donne le point isoélectrique et les conditions de salinité et de concentration protéidique étant comparables, la comparaison des courbures dans la région isoélectrique donne une indication qualitative concernant les solubilités.

Le point isoélectrique de l'euglobuline I est à pH 6,75 et c'est manifestement la fraction la moins soluble (fig. 1). Celui de l'euglobuline I A est à pH 6,6 et la solubilité est intermédiaire. Enfin, l'euglobuline II A, fraction la plus soluble, a aussi le point isoélectrique le



Solubilité en fonction du pH de diverses euglobulines.

plus acide (pH 6,40). Nous remarquerons, toutefois, que même cette dernière fraction a un point isoélectrique sensiblement plus alcalin que celui des globulines banales. Par exemple, Tiselius trouve que le point isoélectrique des γ -globulines est de pH 6 à 6,2 alors que ce sont elles qui possèdent le point isoélectrique le plus alcalin (2). Nous-même avons trouvé autrefois un point isoionique moyen de pH 5,8 à 6 pour les globulines du sérum de cheval (3). Or, ce point isoélectrique remarquablement alcalin paraît être un caractère général de nos euglobulines anticorps (4, 5, 6).

Pourtant, bien que nous ayons ainsi une famille de corps très voisins dont les caractères physiques subissent une modification quasi continue, les propriétés immunologiques ne sont pas les mêmes. L'euglobuline I agglutine très fortement les érythrocytes et ne les hémolyse que relativement très faiblement, alors que l'euglobuline II A agglutine bien moins, mais a un titre hémolytique au moins dix fois plus élevé. L'euglobuline I A possède, en général, et un titre hémolytique et une

(2) TISELIUS, *Biochem. J.*, 1937, **31**, 313 et 1464.

(3) G. SANDOR, *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **17**, 877.

(4) FELTON, *J. inf. Dis.*, 1928, **42**, 256.

(5) GREEN, MCKHANN, KAPNICK et FAHEY, *J. Immunol.*, 1939, **36**, 245.

(6) G. SANDOR et CEDBAHA, *Bull. Soc. Chim. biol.* (sous presse).

activité agglutinante relativement restreints. Les résultats sont sensiblement les mêmes si on les rapporte à poids égal de protéides ou à volume égal de sérum puisque, dans celui-ci, les trois fractions existent sensiblement au même taux (environ 1 p. 1.000 chacune).

La différence entre l'euglobuline I et l'euglobuline II A est surtout marquée si on observe l'agglutination macroscopique. En effet, à des concentrations relativement élevées, allant jusqu'au 1/10 environ par rapport au sérum, l'euglobuline I provoque une prise en masse immédiate et brutale des globules rouges tandis que l'agglutination par l'euglobuline II A se produit, en général, lentement et microscopiquement. Cette prise en masse peut empêcher totalement l'hémolyse et on pourrait ainsi croire qu'en fait l'euglobuline I s'adresse à un agglutinogène érythrocytaire distinct de l'antigène hémolytique. Mais en fait, si on prend soin d'agiter les mélanges de temps à autre, l'hémolyse se produit aussi, tôt ou tard, seulement à un titre plus faible qu'en présence de l'euglobuline II A.

Il y a tout lieu de croire que l'euglobuline I s'adresse au même haptène érythrocytaire que l'euglobuline II A. Si donc la première est surtout agglutinante et la deuxième surtout amboceptrice, il faut incriminer plutôt la nature des radicaux chimiques qui supportent les activités immunologiques dans les molécules protéidiques. Et nous disons bien qu'il doit s'agir d'une différence de groupements fonctionnels, parce que s'il est plus aisé à un protéide moins soluble d'agglutiner, la différence de solubilités à elle-seule n'explique pas une manière d'agir distincte. Dans le sérum de lapin un même anticorps pseudoglobulinique agglutine et fixe le complément, et nous-même avons montré avec M^{lle} Guillaumie (7), que dans les sérums antitoxiques de cheval les agglutinines sont supportées par des pseudoglobulines. Mais, s'il en est ainsi et s'il existe bien un groupement fonctionnel précipitine-agglutinine-tropine distinct d'un autre ambocepteur-opsonine, il reste non moins vrai que le premier est supporté de préférence par un protéide sensiblement moins soluble que le second. Ainsi l'organisme a obéi à un principe de « moindre effort », couplant le groupement fonctionnel avec son support adéquat puisque les deux sont insolubilisants également. Et dans ce fait se manifeste la sélection naturelle, ayant choisi parmi les mutations celle qui était utile.

(Institut Pasteur. Service de Chimie Physique.)

(7) G. SANDOR et GUILLAUMIE, ces *Annales*, 1949, **76**, 550.

ANTIBIOTIQUES ET LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE

III. — RETARD DE LA LYSÉ BACTÉRIOPHAGIQUE PAR LA STREPTOMYCINE, OBSERVÉ AU MICROBIOPHOTOMÈTRE

par Michel FAGUET et Ewald EDLINGER.

P. Nicolle et l'un de nous [Faguet] (1, 2) ont étudié à l'aide du microbiophotomètre de M. Faguet (3) l'action de la pénicilline et du bactériophage introduits dans une culture microbienne ; nous avons pensé que cet appareil pourrait nous aider à saisir la succession des phénomènes qui se produisent, lorsque la streptomycine est introduite dans une culture bactérienne en même temps qu'un bactériophage actif sur celle-ci.

Technique. — Pour pouvoir observer plus facilement la lyse, nous avons choisi le staphylocoque blanc Twort et le bactériophage homonyme qui ne donne qu'exceptionnellement des cultures secondaires [P. Nicolle et P. Ducrest] (4).

Les 6 cuves de l'appareil contenaient chacune 50 cm³ d'eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Uclaf) et étaientensemencées avec des quantités de germes variant de 100.000 à 200.000 par centimètre cube de milieu. Ces germes provenaient d'une culture de dix-huit heures sur gélose inclinée.

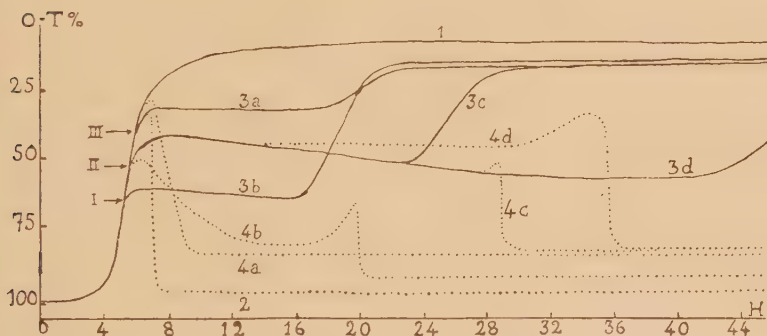
Le titre du bactériophage employé dans toutes les expériences s'est maintenu sensiblement constant à 8.10^9 corpuscules par centimètre cube. La streptomycine provenait d'une solution en eau physiologique d'un échantillon commercial (Merck : Calciumchloride complex) et était utilisée à des concentrations variant de 2 à 500 microgrammes par centimètre cube de milieu. La température était réglée à 37° C et la culture était constamment agitée à l'aide d'un dispositif décrit par M. Faguet (5). Nous nous sommes efforcés d'introduire le bactériophage et la streptomycine vers le milieu de la phase exponentielle de croissance de la culture ; malgré cela, dans les différentes expériences, le moment d'intervention a légèrement varié, facteur qui a rendu plus difficile l'interprétation des résultats.

Pour chaque expérience, le schéma d'emploi des cuves était le suivant :

- (1) P. NICOLLE et M. FAGUET, ces *Annales*, 1947, **73**, 490.
- (2) M. FAGUET et P. NICOLLE, ces *Annales*, 1947, **73**, 1150.
- (3) M. FAGUET, *Act. Sci. et Ind.*, édit. Hermann, Paris, 1941, 102 pages ; *Journ. Suisse de Méd.*, 1946, **44**, 1155.
- (4) P. NICOLLE et DUCREST, ces *Annales*, 1947, **73**, 755.
- (5) M. FAGUET, ces *Annales*, 1947, **73**, 495.

NUMÉRO de la cuve	CULTURE	INTERVENTION
I.	Staph. Twort.	Témoin.
II.	Staph. Twort.	IV gouttes du lysat phagique (témoin bactériophage).
III.	Staph. Twort.	Streptomycine.
IV.	Staph. Twort.	Streptomycine + IV gouttes du lysat.
V.	Staph. Twort.	Streptomycine.
VI.	Staph. Twort.	Streptomycine + IV gouttes du lysat.

Résultat. — Nous avons tenté de synthétiser dans un seul graphique



Ordonnées O — T p. 100, densité optique exprimée en quantité de matière microbienne; abscisses, temps. Les flèches \rightarrow indiquent le moment des interventions 1, témoin; 2, bactériophage seul; 3, streptomycine seule; 4, streptomycine + bactériophage; a, 2 μ g. S par centimètre cube; b, 20 μ g. S par centimètre cube; c, 200 μ g. S. par centimètre cube; d, 500 μ g. S par centimètre cube.

(fig.), malgré la variation du temps d'intervention, les résultats obtenus les plus marquants :

1° Culture seule : courbe de croissance normale.

2° Bactériophage seul : presque immédiatement après l'intervention, la lyse est brusque, totale et durable.

3° Streptomycine seule : la croissance bactérienne s'arrête presque immédiatement après l'introduction de l'antibiotique, mais cet arrêt n'est pas définitif : il se maintient douze heures pour les faibles concentrations (2 μ g) et trente-six heures pour les fortes concentrations (500 microgrammes). Après ces délais, la culture reprend sa courbe ascendante, mais celle-ci n'atteint pas le niveau de la courbe croissance-témoin. Ces cultures, repiquées sur gélose à la fin de l'expérience, se sont montrées d'autant plus streptomycino-résistantes que la concentration de streptomycine à laquelle elles avaient été soumises avait été plus forte. Le moment auquel le bactériophage et l'antibiotique sont introduits dans la culture influe considérablement sur le développement de ces cultures streptomycino-résistantes.

Lorsque le nombre des germes est élevé, l'apparition de la culture est plus précoce que lorsque l'antibiotique est introduit dans une culture moins riche. Il n'a pas été possible dans nos expériences de mettre en évidence un effet lytique net de la streptomycine sur le staphylocoque, bien qu'on ait noté, surtout pour les concentrations les plus fortes, une légère et très lente diminution de l'opacité.

4° Bactériophage et streptomycine :

Après l'introduction simultanée de ces deux agents, la courbe suit plus ou moins fidèlement celle de la culture avec la streptomycine. Il semblerait peut-être même se produire une atténuation de l'inhibition provoquée par la streptomycine seule sur la croissance bactérienne. La poussée tardive de la culture est suivie par une descente brusque : la lyse bactériophagique. L'opacité reste, dans la plupart des cas, très nettement supérieure à celle observée après la lyse avec le bactériophage seul, mais des ensemencements sur gélose des échantillons des cuves n'ont jamais été suivis de cultures positives. Il n'y a donc pas de germes phago-résistants.

Discussion et conclusions. — D. Jones (6), dans une première communication, a écrit que la streptomycine était douée d'un pouvoir antiphage direct ; par la suite, A. Schatz et D. Jones (7) ont attribué l'action antiphage en question, non à la streptomycine elle-même, mais à des impuretés qui l'accompagnaient dans les premières préparations. Néanmoins, l'action antiphage directe a été soutenue à nouveau par S. S. Cohen (8) dans une mise au point récente. L'un de nous [Edlinger] (9) n'est pas parvenu à mettre en évidence cette action antiphage de la streptomycine, mais il a observé que l'antibiotique exerce, sur gélose, une protection très nette de certaines colonies contre la lyse bactériophagique (anneau streptomycinique). Si l'affirmation de D. Jones était exacte, seule l'inhibition produite par la streptomycine sur la culture se manifesterait, au moins pour les doses élevées ; la lyse bactériophagique ne se produirait pas. Or, l'action inhibitrice de la streptomycine sur la croissance bactérienne et la lyse phagique se succèdent distinctement avec leurs caractéristiques particulières. On pourrait supposer que le lysat phagique, soit par son bactériophage, soit par les substances qu'il contient, diminue l'effet bactériostatique de la streptomycine. Mais cette substance produit un retard sensible de la lyse, retard qui pourrait s'expliquer ainsi : Dans la majorité des cas, le bactériophage ne lyse que les germes pendant la période de croissance. Lorsque les cultures sont âgées, ou lorsque leur multiplication est suspendue, soit par suite de conditions défavorables [A. Krueger et J. Fong] (10), soit par l'action d'un antiseptique comme la proflavine [R. Foster] (11), soit par l'action bactériostatique d'un sulfamide [R. Wahl, F. Nitti et M. Faguet] (12) ou d'un antibiotique comme la pénicilline [M. Faguet et P. Nicolle] (2).

(6) D. JONES, *J. Bact.*, 1945, **50**, 122, 341.

(7) A. SCHATZ et D. JONES, *Bull. Torrey Bot. Club*, 1947, **74**, 9.

(8) S. S. COHEN, *Bact. Rev.*, 1949, **43**, 1.

(9) E. EDLINGER, ces *Annales*, 1949, **76**, 396.

(10) A. KRUEGER et J. FONG, *J. gen. Physiol.*, 1937, **21**, 137.

(11) R. FOSTER, *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.

(12) R. WAHL, F. NITTI et M. FAGUET, ces *Annales*, 1946, **72**, 290.

le bactériophage est incapable de provoquer la lyse des bactéries en repos. L'action bactériostatique de la pénicilline étant relativement lente à se manifester, l'antibiotique introduit dans la culture longtemps avant le bactériophage inhibe la lyse, lorsque la culture a été déjà arrêtée par l'action de la pénicilline. L'action synergique de la pénicilline et du bactériophage étudiée par P. Nicolle et M. Faguet (1) ne se manifeste que si le bactériophage est introduit au moment où la pénicilline n'a pas encore exercé son action bactériostatique.

La streptomycine, au contraire, produit l'arrêt de la croissance immédiatement après son introduction dans une culture de staphylocoques, mais, après un temps variable selon la concentration en antibiotique, on observe le développement d'une culture streptomycino-résistante. Dès l'apparition de celle-ci, qui se traduit par une ascension assez rapide de la courbe, la culture streptomycino-résistante subit la lyse phagique.

L'anneau de colonies streptomycino-résistantes apparues sur gélose en milieu fortement contaminé par le bactériophage, tel qu'un de nous [Edlinger] (9) l'a décrit dans un travail antérieur, avait montré que la streptomycine exerçait vis-à-vis de la lyse bactériophagique une action protectrice, mais il était difficile, dans les conditions des expériences sur milieu solide, d'expliquer en quoi consistait cette action.

Les résultats des expériences relatées dans le présent travail nous permettent, au contraire, de retenir l'une des nombreuses hypothèses qui se présentaient à l'esprit : la lyse bactériophagique des germes devenus streptomycino-résistants serait retardée jusqu'à ce que certains de ces germes aient donné des colonies visibles. A ce moment, les colonies seraient trop âgées pour subir la lyse bactériophagique ainsi différée. On sait, en effet, que les cultures de staphylocoque de plus de huit heures à 37° C ne sont plus sensibles au bactériophage, du moins à la lyse massive par ce dernier.

Malgré la vraisemblance de cette hypothèse, nous pensons qu'un certain nombre d'autres facteurs encore inconnus entrent probablement en jeu.

Résumé : La streptomycine ajoutée seule à une culture du staphylocoque blanc Twort produit un arrêt rapide de cette culture et, d'autre part, permet la formation, après des délais variables suivant les concentrations, de cultures streptomycino-résistantes.

La streptomycine n'empêche pas la lyse par le bactériophage Twort ajouté en même temps qu'elle, mais elle la retarde considérablement. Cette lyse, quoique différée, garde son allure soudaine à partir du moment où elle commence. Elle laisse subsister une turbidité résiduelle qui ne paraît pas due à la présence de germes vivants.

Le retard dans l'évolution de la lyse bactériophagique expliquerait la formation sur milieu solide, par action combinée de la streptomycine et du bactériophage, d'un anneau de colonies indemnes de bactériophagie, tel que l'un de nous (Edlinger) l'a décrit antérieurement.

(Institut Pasteur.)

ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE DE LA PAPAÏNE

par R. BABIN, J. BRISOU et A. RIGAUD.

Dans une note précédente (1), nous avons attiré l'attention sur l'action bactériostatique de la papaïne vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* locale.

La poursuite de l'expérimentation sur différents microbes montre que l'enzyme ne limite pas son activité à une seule espèce.

Conditions expérimentales. — Des cultures en bouillon de viande peptoné sans glucides sont tamponnées à pH=7,0 à l'aide de phosphates ou par citrate de soude.

On utilise des solutions de papaïne commerciale délipidée par l'éther fraîchement distillé. Les solutions en eau distillée sont à 10 p. 100 ; elles sont stérilisées par chauffage à 56° pendant une demi-heure (nous avons vérifié que ce traitement ne diminuait en rien l'activité protéolytique) et ajoutées au milieu au moment de l'emploi.

La concentration finale des bouillons en diastase est de 0,5 à 1 p. 100. Comme indicateur de croissance nous utilisons une solution de bleu de méthylène (2) ; nous laissons les cultures à l'étuve à 37° pendant trois jours.

Dans ces conditions, les germes sensibles à l'action antibactérienne de la papaïne, dont les cultures restent négatives, sont les suivants : *Staphylococcus aureus* (souche Londres testée), Streptocoque hémolytique (plusieurs souches), *Brucella abortus suis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella paradysenteriae* Flexner, V. W, X, Y et Z, certaines souches de coliformes.

Les germes absolument insensibles, dont les cultures poussent normalement en présence de papaïne, sont les suivants : *Bacillus subtilis*, *Salmonella paratyphi* B type schottmüller, *Salmonella enteritidis*, var. gaertner, *Salmonella typhi murium*, *Proteus* OX19, un grand nombre de coliformes, *Pseudomonas aeruginosae*, var. cyan. Enfin, il existe des germes pour lesquels la papaïne prolonge la phase de latence et retarde considérablement la croissance : *Streptococcus fecalis*, *Salmonella paratyphi* A et *paratyphi* C, *Proteus* OX 2 sont dans ce cas.

Il résulte de ces faits que la papaïne est douée d'un pouvoir bactériostatique net pour un certain nombre de germes, qu'ils soient Gram négatifs ou Gram positifs. Les bactéries ayant besoin de facteurs de croissance comme le staphylocoque, le bacille d'Eberth (*S. typhi*) les *Shigella*, etc., semblent les plus sensibles à l'action de l'enzyme.

Des expériences en cours sur milieu synthétique avec établissement de courbes de croissance ont pour objet l'étude du mécanisme de cet action bactériostatique de la papaïne.

(Laboratoire de l'Ecole de Santé Navale, Bordeaux.)

(1) A. RIGAUD, R. BABIN et J. BRISOU, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 399.

(2) PENNANEACH, MORAND et GUENNEC, *Rev. Méd. Navale*, 1947, **41**, 387.

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etudes sur le collagène. II. Nouvelles recherches sur les collagénases bactériennes. III. Action d'une collagénase sur des scléroses expérimentales ; premiers résultats, par M^{me} M. DELAUNAY, M^{lle} M. GUILLAUMIE et M. A. DELAUNAY.

Détermination des types bactériophagiques (Vi-phage typing) et caractères biochimiques des souches de *S. typhi* isolées dans les hôpitaux militaires de France et de l'Union Française, par A. JUDE et P. NICOLLE.

Epidémie de grippe 1948-1949. Etude du virus, par P. LÉPINE, V. SAUTTER, L. REINIE et J. MAURIN.

Activité comparée de la péniciline sur la croissance de *B. subtilis* en milieu synthétique ammoniacal et en milieu peptoné, par N. GRELET.

Le Gérant : G. MASSON.

